

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**



**DESARROLLO DE UN ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETECCIÓN  
DE IONES METÁLICOS UTILIZANDO LA ENZIMA PAPAÍNA  
INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS POLIMÉRICAS ELECTROHILADAS**

**POR**  
**BRENDA JANETT ALONSO GUTIÉRREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN  
EN NANOTECNOLOGÍA**

**OCTUBRE 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**



**TESIS**

**DESARROLLO DE UN ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETECCIÓN  
DE IONES METÁLICOS UTILIZANDO LA ENZIMA PAPAÍNA  
INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS POLIMÉRICAS ELECTROHILADAS**

**POR  
BRENDA JANETT ALONSO GUTIÉRREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN  
EN NANOTECNOLOGÍA**

**OCTUBRE 2016**

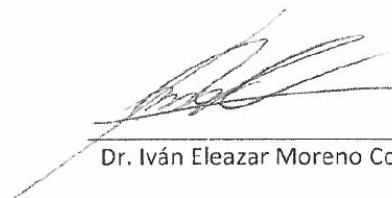
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE INGENIERIA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**


Los miembros del Comité de Tesis recomendamos que la Tesis “Desarrollo de un ensayo enzimático para la detección de iones metálicos utilizando la enzima papaína inmovilizada en nanofibras poliméricas electrohiladas” realizada por el alumno(a) Brenda Janett Alonso Gutiérrez, con número de matrícula 970021, sea aceptada para su defensa como opción al grado de Maestría en Ciencias con orientación en Nanotecnología.

El comité de tesis



Dr. Iván Eleazar Moreno Cortez

Director




Dr. Luis Alberto López Pavón

Co-Director



Dr. Daniel Sánchez Martínez

Revisor



Vo.Bo.  
Dr. Simón Martínez Martínez  
Subdirector de Estudios de Postgrado

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

OCTUBRE 2016

## DEDICATORIA

*A la necedad y la terquedad*

## FINANCIAMIENTO

El presente trabajo de investigación fue financiado:

Por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el proyecto #176671 y el proyecto # 219535, ya que sin este apoyo financiero este trabajo no habría podido llevarse a cabo.

Por el apoyo brindado a la investigación científica de este trabajo por parte del Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) y Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica (FIME).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Iván E. Moreno Cortez profesor investigador de la FIME. Agradezco la oportunidad que me ofreció y por haber tenido la confianza de apoyarme en la realización de esta tesis.

Al Dr. Luis Alberto López Pavón profesor investigador de la FIME. Al Dr. Daniel Sánchez Martínez profesor investigador de la Facultad de Ingeniería Civil por su amistad y apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

A todos mis profesores que me han formado y han contribuido de alguna manera a la realización de este trabajo.

A mi familia, amigos y compañeros que han apoyado todos mis proyectos.

## **CONTENIDO**

<u>COMITÉ DE TESIS</u>	<u>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</u>
<u>DEDICATORIA</u>	<u>3</u>
<u>FINANCIAMIENTO</u>	<u>4</u>
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	<u>5</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>9</u>
<u>LISTA DE TABLAS</u>	<u>10</u>
<u>RESUMEN</u>	<u>11</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>12</u>
<u>1.1 INTRODUCCIÓN.</u>	<u>13</u>
<u>2.1 ANTECEDENTES</u>	<u>16</u>
2.1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA	17
<u>2.2 LA IMPORTANCIA DE LA DETECCIÓN DE LOS IONES METÁLICOS EN MEDIOS ACUOSOS Y SU IMPACTO EN LA SALUD</u>	<u>17</u>
2.2.1 METALES PESADOS EN MÉXICO.	20
<u>2.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE METALES PESADOS</u>	<u>22</u>
2.3.1 BIOENSAYOS PARA DETECCIÓN DE IONES METÁLICOS.	23
<u>2.4 ENZIMAS</u>	<u>25</u>
2.4.1 INHIBIDORES DE ENZIMAS	26
2.4.2 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	28
2.4.2.1 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN NANOESTRUCTURAS	29
2.4.2.1.1 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS EN NANOFIBRAS ELECTROHILADAS	30

<b>2.5 LA ENZIMA PAPAÍNA</b>	<b>32</b>
2.5.1 SITIO ACTIVO	33
2.5.2 MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE LA PAPAÍNA EN NANOESTRUCTURAS	34
2.5.3 PAPAÍNA UTILIZADA EN ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE DETECCIÓN DE IONES METÁLICOS	34
<b>2.6 MOTIVACIÓN O JUSTIFICACIÓN</b>	<b>35</b>
<b>2.7 HIPÓTESIS</b>	<b>35</b>
<b>2.8 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>35</b>
2.8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>REFERENCIAS</b>	<b>36</b>
3.1 MATERIALES Y REACTIVOS	46
3.2 ENCAPSULACIÓN DE PAPAÍNA	46
3.2.1 INMOVILIZACIÓN DE PAPAÍNA	46
3.3 DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE ENZIMA ENCAPSULADA	47
3.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y ESTUDIOS DE INHIBICIÓN E INTERFERENCIA	48
3.4.1 PREPARACIÓN DEL SUSTRATO ACTIVADOR	48
3.4.2 PREPARACIÓN DE IONES METÁLICOS	48
3.4.3 PREPARACIÓN DE XENOBIÓTICOS	49
3.4.4 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA	49
3.5 EQUIPOS UTILIZADOS	51
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>68</b>
4.1. MORFOLOGÍA DE LAS NANOFIBRAS ELECTROHILADAS	68
4.2 PRESENCIA DE LA ENZIMA PAPAÍNA EN LAS NANOFIBRAS DE PVA	70
4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	70
4.3 ANÁLISIS TÉRMICO POR CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	71
4.4 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA ENZIMA PAPAÍNA INMOVILIZADA	74
4.4.1 SENSIBILIDAD DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA AL CAMBIO EN LA CONCENTRACIÓN DE LOS IONES METÁLICOS EN EL MEDIO DE REACCIÓN	74
4.4.1.1 EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN MERCURIO ( $Hg^{+2}$ ) EN EL MEDIO DE REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA.	76
4.4.1.2 EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN PLATA ( $Ag^{+1}$ ) EN EL MEDIO DE REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA.	78
4.4.1.3 EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN COBRE ( $Cu^{+2}$ ) EN EL MEDIO DE REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA.	80
4.4.1.4 EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN ZINC EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA.	82



4.4.1.5 EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN COBALTO ( $\text{Co}^{+2}$ ) EN EL MEDIO DE REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA.	84
4.5 ESTUDIOS DE INTERFERENCIA	86
4.5.1 ESTUDIO DE INTERFERENCIA DE XENOBIÓTICOS EN PRESENCIA DEL IÓN PLATA ( $\text{Ag}^{+1}$ )	88
4.5.2 ESTUDIO DE INTERFERENCIA EN PRESENCIA DEL IÓN ZINC ( $\text{Zn}^{+2}$ )	89
4.5.3 ESTUDIO DE INTERFERENCIA EN PRESENCIA DEL IÓN COBRE ( $\text{Cu}^{+2}$ )	90
4.5.4 ESTUDIO DE INTERFERENCIA EN PRESENCIA DEL IÓN COBALTO ( $\text{Co}^{+2}$ )	91
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>109</b>
5.1 TRABAJO A FUTURO	110

## LISTA DE FIGURAS

FIG. 1 PROCESO EXPERIMENTAL DEL ENSAYO ENZIMÁTICO .....	14
FIG. 2 DISTRIBUCIÓN DE LOS VOLÚMENES CONCESIONADOS PARA USOS CONSUNTIVOS.....	17
FIG.3 FUENTE DE LOS METALES PESADOS Y SU CICLO EN EL ECOSISTEMA SUELO-AGUA-AIRE [13].....	18
FIG. 4 ÓRGANOS DEL CUERPO AFECTADOS INGESTA DE METALES PESADOS. ....	19
FIG. 5 MODELO LLAVE-CANDADO .....	26
FIG. 6 PRINCIPALES MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN .....	29
FIG. 7 APLICACIONES DE LAS NANOFIBRAS ELECTROHILADAS .....	32
FIG. 8 REPRESENTACIÓN TRIDIMENSIONAL DE LA ESTRUCTURA DE LA PAPAÍNA[124].....	33
FIG. 9 ESTRUCTURA DEL SITIO ACTIVO DE LA PAPAÍNA.....	33
FIG. 10 PROCESO DE INMOVILIZACIÓN DE LA ENZIMA PAPAÍNA.....	47
FIG. 11 PROCESO DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	48
FIG. 12 ESQUEMA DEL PROCESO DE LA MEDICIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA .....	50
FIG. 13 ESQUEMA DEL PROCESO DE LA MEDICIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PRESENCIA DE IONES METÁLICOS.....	50
FIG. 14 ESQUEMA DEL PROCESO DE LA MEDICIÓN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN PRESENCIA DE IONES METÁLICOS E INTERFERENTES .....	51
FIG. 15 IMÁGENES DE SEM A) NANOFIBRAS DE PVA, B) NANOFIBRAS DE PVA-ENZIMA PAPAÍNA, DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE LAS MORFOLOGÍAS C) DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE NANOFIBRAS DE PVA, D) DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE NANOFIBRAS DE PVA-ENZIMA PAPAÍNA. ....	68
FIG. 16 IMÁGENES DE SEM A) NANOFIBRAS PVA-ENZIMA PAPAÍNA DESPUÉS DEL PROCESO DE ENTRECRUZAMIENTO, B) NANOFIBRAS DE PVA-ENZIMA PAPAÍNA DESPUÉS DE LA SUMERSIÓN EN BUFFER. C) DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE NANOFIBRAS PVA-ENZIMA PAPAÍNA DESPUÉS DEL PROCESO DE RETICULADO, D) DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE NANOFIBRAS DE PVA-ENZIMA PAPAÍNA DESPUÉS DEL USO DEL BUFFER. ....	69
FIG. 17 ESPECTROS DE INFRARROJO (A) NANOFIBRAS DE PVA SIN CARGA ENZIMÁTICA, (B) MUESTRA DE PAPAÍNA ENCAPSULADA EN NANOFIBRAS DE PVA, (C) MUESTRA DE PAPAÍNA INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS DE PVA MEDIANTE ENTRECRUZAMIENTO CON GA .....	71
FIG. 18 COMPORTAMIENTO DE LA Tg CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA EN LA MATRIZ DE NANOFIBRAS DE PVA .....	72
FIG. 19 COMPORTAMIENTO DE LA ENTALPÍA DE FUSIÓN CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA.....	73
FIG. 20 COMPORTAMIENTO DEL PICO DE FUSIÓN CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA.....	74
FIG. 21 SENSIBILIDAD DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA HACIA EL CAMBIO DE CONCENTRACIÓN DE LOS DIVERSOS METALES. MERCURIO (Hg), ZINC (Zn), COBRE (Cu), COBALTO (Co), PLATA (Ag). ....	76
FIG. 22 TENDENCIA DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN MERCURIO ( $Hg^{+2}$ ) EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS DE PVA.....	77
FIG. 23 TENDENCIA DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN PLATA ( $Ag^{+1}$ ) EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS DE PVA.....	80
FIG. 24 TENDENCIA DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN COBRE ( $Cu^{+2}$ ) EN EL MEDIO DE REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS DE PVA.....	81
FIG. 25 TENDENCIA DEL EFECTO DE LA PRESENCIA DEL IÓN ZINC ( $Zn^{+2}$ ) EN EL MEDIO DE REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA PAPAÍNA INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS DE PVA.....	83
FIG. 26 TENDENCIA DEL EFECTO DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA PRESENTADO POR LA PAPAÍNA INMOVILIZADA EN NANOFIBRAS DE PVA DEBIDO A LA PRESENCIA DEL IÓN COBALTO ( $Co^{+2}$ ) EN EL MEDIO DE REACCIÓN. ....	85
FIG. 27 PORCENTAJE DE INTERFERENCIA DEL IÓN PLATA ( $Ag^{+1}$ ) EN PRESENCIA DE XENOBIÓTICOS EN EL MEDIO DE REACCIÓN. ....	88
FIG. 28 PORCENTAJE DE INTERFERENCIA DEL IÓN ZINC ( $Zn^{+2}$ ) EN PRESENCIA DE XENOBIÓTICOS EN EL MEDIO DE REACCIÓN .....	90
FIG. 29 PORCENTAJE DE INTERFERENCIA DEL IÓN COBRE ( $Cu^{+2}$ ) EN PRESENCIA DE XENOBIÓTICOS EN EL MEDIO DE REACCIÓN .....	91

FIG. 30 PORCENTAJE DE INTERFERENCIA DEL IÓN COBALTO ( $\text{Co}^{+2}$ ) EN PRESENCIA DE XENOBIÓTICOS EN EL MEDIO DE REACCIÓN .....92

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. PUBLICACIONES SOBRE CONTAMINACIÓN CON METALES PESADOS EN MÉXICO.....	21
TABLA 2. ENSAYOS ENZIMÁTICOS PARA DETECCIÓN DE METALES.....	24
TABLA 3. COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE INHIBICIÓN REVERSIBLE.....	28
TABLA 4. ENZIMAS INMOVILIZADAS USANDO TÉCNICA DE ELECTROHILADO .....	31

## Resumen

En este trabajo, la enzima papaína inmovilizada se utiliza como ensayo para detectar la presencia de iones de metales. Enzima papaína (E.C. 3.4.22.2, 1.6 U/mg) fue inmovilizada en poli (alcohol vinílico) (PVA) sintetizadas bajo la técnica de electrohilado. La distribución del diámetro de las fibras se encontró en el rango de 80 a 170 nm, fue caracterizada con apoyo microscopio electrónico de barrido (SEM). La presencia de la enzima dentro de las nanofibras de PVA se confirmó por espectroscopia infrarroja (FTIR), Calorimetría de barrido diferencial (DSC). La inmovilización de la papaína en la membrana de nanofibras se logró mediante la Reticulación (crosslinking) con un tratamiento de vapor de glutaraldehído (GAvt). La actividad enzimática se realizó de acuerdo a la metodología utilizada por Earlander et al. método adaptado a la papaína. El sitio activo de la papaína es afectado por la presencia de iones metálicos en el medio de reacción, el ensayo desarrollado es sensible a varios iones de los metales. Se utilizaron: cloruro de mercurio (I) ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ), nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), nitrato de cobalto (II) ( $\text{Co}_2\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro cúprico ( $\text{CuCl}_2$ ), cloruro de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) en concentraciones de 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30 ppm and 40 ppm. El ensayo de la papaína comprobó ser tolerante a los xenobióticos, temperatura estable, y tiene un tiempo de ensayo relativamente rápido. La actividad catalítica de la enzima papaína inmovilizada se analizó en presencia de xenobióticos y los iones de los metales a través de UV-visible.

## **Abstract**

In this work, the immobilized papain enzyme was used as an assay to detect the presence of metals ions. Papain enzyme (E.C. 3.4.22.2, 1.6 U/mg) immobilization in poly(vinyl alcohol) (PVA) nanofibers prepared by electrospinning was carried out in this work. The diameter distribution was in the range of 80 to 170 nm. The presence of the enzyme within the PVA nanofibers was confirmed by infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The immobilization of papain in the nanofiber membrane was achieved by chemical crosslinking with a glutaraldehyde vapor treatment (GAVt). The enzymatic activity it was performed according to the methodology using by Earlander et al. method adapted to the papain. Since the active site of the papain could be affected by the presence of metal ions in the reaction medium, the developed assay is sensitive to several metals ions. Mercury (I) chloride ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ), silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ), cobalt (II) nitrate hexahydrate ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cupric chloride ( $\text{CuCl}_2$ ), zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ ) in different concentration 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30 ppm and 40 ppm were used. The papain assay was probed to be xenobiotics tolerant, temperature stable, and has a relatively quick assay time. The catalytic activity of immobilized papain enzyme was analyzed in the presence of xenobiotics and metals ions through UV–visible.

### **1.1 Introducción.**

En términos generales, un trabajo de investigación que aborde la contaminación del agua es de gran importancia para la calidad de vida de la sociedad. Es un problema vital para la sobrevivencia de nuestra especie y otras especies animales amenazadas por la contaminación de las fuentes de agua. Por ello la comunidad científica ha incrementado las investigaciones referentes a esta problemática, tanto para su detección como su remediación. Según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud, el agua está contaminada cuando su composición se haya alterada de modo que no reúna las condiciones necesarias para el uso para el que fue destinada en su estado natural; de igual manera el agua se encuentra contaminada cuando su estado se encuentre modificado, directa o indirectamente, por el hombre o por eventos naturales. En este trabajo se aborda la contaminación del agua es debido a metales pesados y xenobióticos.

Los metales pesados (Cu, Zn, Cd, Ni, Hg, Pb, As) se encuentran de manera natural en el ambiente y a muy bajos porcentajes no se consideran nocivos para los ecosistemas, sin embargo esto cambia cuando se incrementa su concentración aumenta y su presencia deriva en efectos adversos en la salud de los organismos. En la actualidad la contaminación de las aguas con metales pesados se ha convertido en una grave amenaza para el medio ambiente debido al cambio climático pero sobre todo a la expansión de actividades antropogénicas y el crecimiento demográfico. En ese sentido, la importancia de la detección de metales pesados en aguas está dada por sus características, tales como su elevada toxicidad, alta persistencia y rápida acumulación en los organismos vivos. Todo esto puede provocar padecimientos y trastornos graves de salud como cáncer, anemia, daño cerebral, anorexia, retraso mental, hipertensión, entre otros. Por lo anterior se ha vuelto necesario el desarrollo de métodos simples, eficaces y sobre todo de bajo costo para su oportuna detección en muestras de agua contaminada. En la actualidad se pueden encontrar en el mercado bioensayos para la detección de metales pesados basados en el principio de inhibición enzimática, ofreciendo capacidades de rendimiento excepcionales, las cuales incluyen alta especificidad, sensibilidad, respuesta rápida y bajo costo. Dichos

ensayos se basan en que cuando existe presencia de este tipo de contaminantes en el medio de reacción, cierto tipo de enzimas tienden a disminuir su actividad enzimática.

En el presente trabajo de investigación se realizó la inmovilización y encapsulación de la enzima papaína en nanofibras de alcohol polivinílico (PVA) mediante la técnica de electrohilado y se determinó su actividad en la presencia de iones de metales pesados en medios acuosos. Como complemento también se realizaron pruebas en presencia de xenobióticos, ya que en recientes años el uso de estos se ha expandido y se pueden encontrar en afluentes cercanos a áreas industriales y agrícolas por lo cual es necesario que cualquier ensayo basado en inhibición enzimática mantenga su especificidad en presencia de estos, la figura 1 muestra el esquema del proceso experimental del ensayo

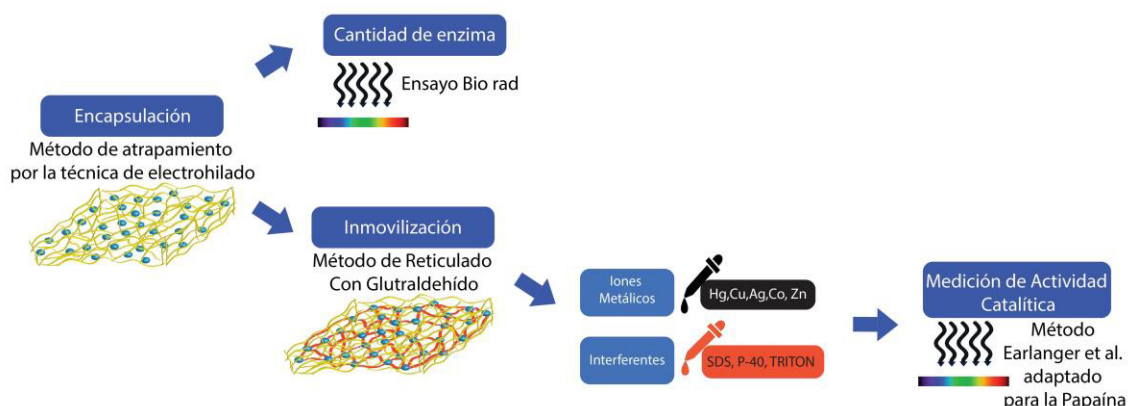


Fig. 1 Proceso experimental del ensayo enzimático

Las enzimas son proteínas que actúan como facilitadores o catalizadores de reacciones bioquímicas asociadas con la función de los organismos vivos. Este tipo de proteínas funcionan como máquinas moleculares altamente especializadas capaces de romper, ensamblar, o transformar moléculas. La historia de las enzimas inmovilizadas para la detección de metales es reciente, pero se ha demostrado en diferentes publicaciones que son un método fiable y menos costoso en comparación con los sistemas que se cuenta actualmente, sin embargo se tiene un gran trabajo de investigación por delante. En el capítulo II, se presenta una revisión bibliográfica que sirve como antecedente de la presente investigación. En una primera instancia se proporcionan datos de problemas de contaminación con metales pesados en el agua y los daños que ocasionan estos en la salud,

se mencionan de manera breve los métodos existentes para la detección de contaminantes, se hace extensa la definición de enzimas así como los diferentes tipos de inhibición enzimática e inmovilización. Se citan, además, diversos trabajos que se han desarrollado recientemente sobre el tema que atañe a esta investigación.

En el tercer capítulo, se detalla el proceso experimentación, materiales, métodos y equipos utilizados. El efecto del proceso de inmovilización y encapsulación de la enzima en la morfología de las nanofibras se caracterizó mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). La determinación de la actividad enzimática en presencia de iones metálicos se comprobó mediante la inhibición de su actividad enzimática utilizando la técnica de espectroscopia de ultravioleta visible (UV-Vis). La morfología y distribución del diámetro de las nanofibras fue caracterizada mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM), la presencia de la enzima dentro de las nanofibras de PVA se confirmó por espectroscopia infrarroja (FTIR). Se realizó el análisis térmico de las nanofibras mediante el calorímetro diferencial de barrido (DSC). La evaluación de la cantidad de proteína inmovilizada en las fibras se realizó utilizando un espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV/Vis).

Los resultados y discusiones se exponen en un cuarto capítulo, donde se discute la distribución de diámetros de las nanofibras, la presencia de la enzima en las nanofibras, el comportamiento térmico de estas con respecto al PVA correlacionado a la variación de la concentración enzimática. Además, se presentan los resultados de la sensibilidad de la actividad enzimática en presencia de iones metálicos y xenobióticos mediante su correlación con diversos modelos matemáticos.

Por último, en el quinto capítulo se detallan las conclusiones del presente trabajo de investigación, así como del posible trabajo a futuro.



## 2.1 Antecedentes

El agua es esencial para todos los organismos vivos, sin embargo, si esa agua está contaminada puede ser un importante factor de riesgo en la contracción de enfermedades. De aquí surge que la detección de contaminantes tales como los metales pesados se ha convertido en una prioridad para la sociedad actual. Se estima que la cantidad total de agua (océanos, lagos, ríos, regiones polares, glaciares, aguas subterráneas, el agua de la biosfera y la atmósfera) en el planeta es de aproximadamente  $1.4 \times 10^9 \text{ km}^3$ , lo que significa que el 72 % del planeta está cubierto de agua, sin embargo el 97 % de esta masa de agua es agua salada, inservible para consumo humano, riego de cultivos o usos industriales [1]. Todo esto combinado a la contaminación de las vías fluviales ha desencadenado uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, el cual se ha ido agudizando con el tiempo por el crecimiento demográfico exponencial de la población humana a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en su boletín anual *World Health Statistics* [2] que la proporción de la población sin acceso sostenible a fuentes de agua potable se redujo a la mitad entre 1990 y 2015. Sin embargo, existen todavía aproximadamente 748 millones de personas sin acceso a fuentes de agua de consumo. Aunado a lo anterior, existen grandes disparidades entre diferentes regiones del mundo, así como también entre las zonas urbanas y áreas rurales, al igual que entre los diferentes grupos socioeconómicos dentro de una misma comunidad. México cuenta con un vasto sistema de recursos hídricos: 722 cuentas hidrológicas, 653 acuíferos y 150 ríos. Anualmente cuenta con 460 mil millones de metros cúbicos de agua dulce renovable [3][4]. Del agua utilizada para uso consuntivo<sup>1</sup>, es decir para el abastecimiento agrícola, doméstico, industrial y para las termoeléctricas, el 63% proviene de fuentes superficiales (ríos, arroyos y lagos), mientras que el 37% restante proviene de fuentes subterráneas (acuíferos). En la figura 2 se muestra la distribución del uso del agua[3].

Para el año 2030 se proyecta que el agua disponible por año será de  $3,783 \text{ m}^3$  por habitante, esto es  $478 \text{ m}^3$  menos, en comparación con el año 2009, cuando la disponibilidad era de  $4,261 \text{ m}^3$  por habitante[5]. Consecuentemente, como se puede

---

<sup>1</sup> Uso consuntivo es cuando existe consumo, entendido como la diferencia entre el volumen suministrado y el volumen descargado.

concluir, nuestro país enfrenta grandes desafíos respecto de la disponibilidad del agua. Esto debido al impacto del cambio climático, a la mala administración de los recursos hídricos, a la falta de recursos para la investigación y el desarrollo tecnológico, la falta de planificación ambiental y sobre todo a la contaminación de fuentes acuosas[6].

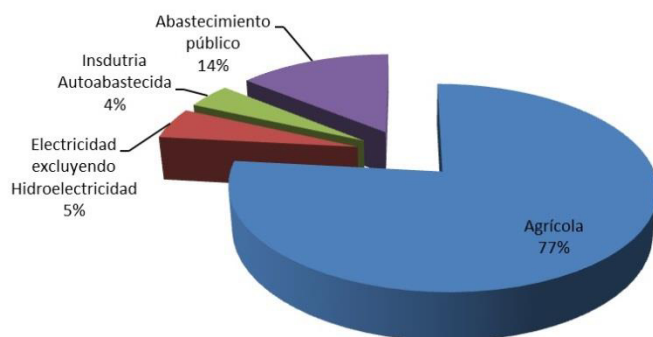


Fig. 2 Distribución de los volúmenes concesionados para usos consuntivos

### 2.1.1 Contaminación del agua

La OMS define como agua contaminada cuando la composición de esta se encuentre alterada de tal modo que no reúna las condiciones necesarias para el uso para el que fue destinada en su estado natural, o bien cuando el estado del agua este modificado, directa o indirectamente, por el hombre, o por eventos naturales [7].

### 2.2 La importancia de la detección de los iones metálicos en medios acuosos y su impacto en la salud

Los iones metálicos se encuentran naturalmente en el ambiente y se introducen en los ecosistemas a través de procesos naturales [8][9]. Debido a que no son biodegradables pueden acumularse en el medio ambiente [10]. Si la acumulación de estos metales en los ecosistemas es mayor a la necesaria para el equilibrio medioambiental, con el paso del tiempo deriva en efectos adversos a la salud de los organismos. Durante el presente siglo ha habido una extracción intensiva de estos metales para usos industriales [11], lo que derivó en la acumulación en el medio ambiente de estos iones metálicos procedentes de actividades antropogénicas (minería, agricultura, combustión de carbón, derrame de petroquímicos, urbanización, deforestación) [12]. La acumulación de estos metales en el medio ambiente ocasionada por el hombre supera a las contribuciones debido a fuentes naturales (atmósfera, erupciones volcánicas, los incendios forestales); como consecuencia,

en la actualidad la contaminación de las aguas con metales pesados se ha convertido en un problema de salud pública y una grave amenaza para el medio ambiente debido a la expansión de dichas actividades antropogénicas y al crecimiento demográfico exponencial de la población. La importancia de la detección de iones de metales pesados en aguas y sedimentos está dada por sus características perjudiciales, tales como su elevada toxicidad, alta persistencia y rápida acumulación en los organismos vivos. La figura 3 muestra el ciclo de los metales pesados y como ingresan a la cadena alimenticia, facilitando la ingesta de metales pesados por los organismos del ecosistema, el ciclo se construye de izquierda a derecha, lo que indica la vulnerabilidad del hombre a la toxicidad de metales pesados.[13]. En la figura 4 se muestran los órganos del cuerpo humano y los metales que causan su mal funcionamiento [14][15].

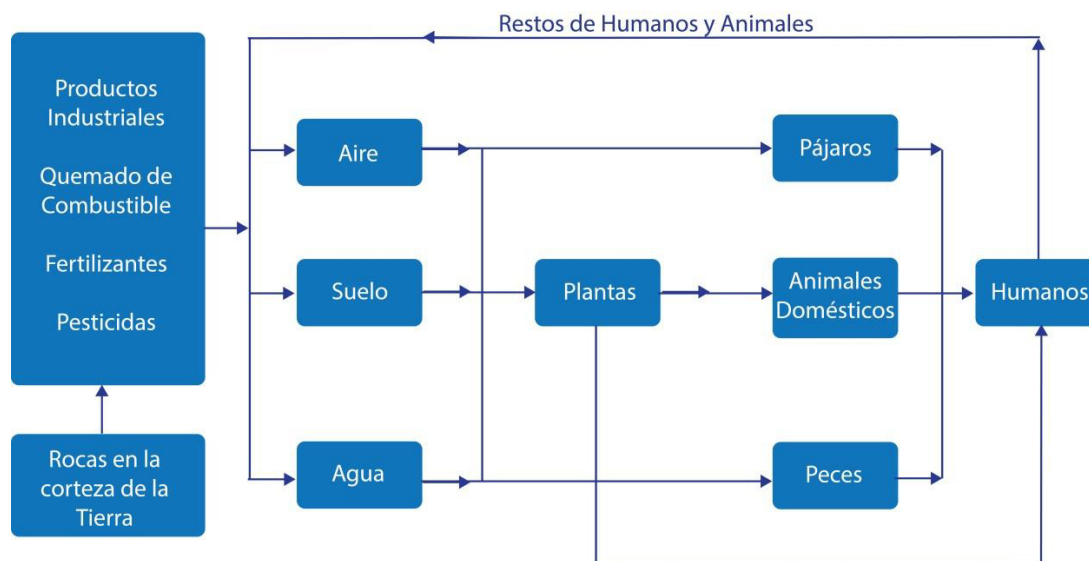


Fig.3 Fuente de los metales pesados y su ciclo en el ecosistema suelo-agua-aire [13].

De esta manera, es de esperarse que a lo largo de la historia se hayan presentado catástrofes por contaminación de aguas con metales pesados. Entre los ejemplos más conocidos podemos mencionar el que ocurrió en mayo de 1956, cuando fue detectada la enfermedad de Minamata, la cual se presentó como un desorden neurotóxico causado por la ingesta de productos marinos contaminados con compuestos de metilmercurio. Como después se descubrió, dichos compuestos contaminantes fueron vertidos en la Bahía de Minamata por la empresa Shin-Nippon Chisso Hiryo K.K., lo cual provocó la contaminación de las fuentes de agua de toda la región.

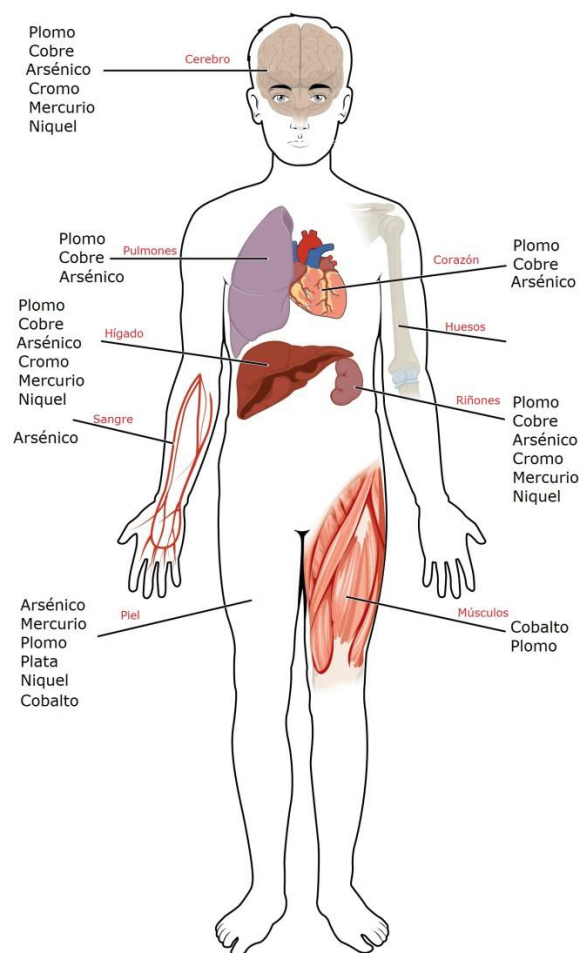


Fig. 4 Órganos del cuerpo afectados ingesta de metales pesados.

Entre los síntomas principales de esta enfermedad podemos mencionar los trastornos sensoriales, ataxia, contracción concéntrica del campo visual, y desordenes auditivos. Cabe mencionar que no solo la población humana presentó este tipo de repercusiones en la salud, sino también toda la fauna de la zona. Finalmente, después de numerosas campañas de limpieza de las aguas y sus sedimentos, en 1997 se declaró que los peces y mariscos de la zona eran aptos para el consumo humano y se retiró la red de protección que había sido instalada desde 1974 para que los peces contaminados no salieran del área contaminada de la bahía [16]. En el sudeste de Asia se están desarrollando estrictas regulaciones sobre la emisión de este tipo de contaminantes, ya que se han encontrado altas concentraciones de metales pesados en aguas subterráneas[17]. De igual manera se han reportado problemas de altas concentraciones de arsénico en las aguas profundas por causas naturales y actividades antropogénicas en Bangladesh [18][19], Oeste de Bengal

(India)[18], Tailandia[17], China[20] y Vietnam[21]. En Taiwán se encontraron casos de la enfermedad del pie negro, problemas cardiovasculares y cáncer de piel relacionados con altas concentraciones de arsénico en fuentes de agua[22][23][24]. En el sur de Tailandia (India) se realizaron estudios toxicológicos en pozos de agua, en los cuales se encontraron concentraciones de cadmio (Cd) y mercurio (Hg) mayores a las permitidas por la OMS en fuentes de agua para consumo humano[25]. En Pakistán se han reportado casos de anemia, puntos blancos en la piel, problemas respiratorios y debilidad general por la presencia de altas concentraciones de arsénico (As) en fuentes acuáticas, así como de hipertensión debido a la presencia de altas concentraciones de plomo (Pb)[26]. En Estados Unidos se ha vinculado la presencia de arsénico en fuentes de agua a problemas de próstata, melanoma y cáncer de vejiga[27]. En centro y Sudamérica se han reportado niveles altos de arsénico en ecosistemas de lugares tales como Nicaragua, Salvador, Argentina y Chile [28][29][30]. En otros países de la región, como Brasil se han reportado altos niveles de plomo en ríos y lagos de la región[31]. En la zona de la Amazonia se encontraron índices elevados de mercurio en ríos y vertientes de la zona[32][33][34][35]. En el río Rin , Danubio y el Volga, los 3 ríos más grandes en Europa, se han presentado históricamente altos índices de contaminación[36][37][38].

### **2.2.1 Metales pesados en México.**

México no es la excepción en respecto a la contaminación por metales pesados, en la literatura se pueden encontrar casos a lo largo de todo el territorio; por ejemplo al noroeste del país, en el Río San Lorenzo se encontraron concentraciones de arsénico, cadmio, mercurio, plata y zinc en sedimentos y aguas de la zona [39]. En la Reserva de Madín la cual se encuentra ubicada sobre el río Tlalnepantla y el pueblo de Madín se encontraron xenobióticos y metales pesados[40] . Por otra parte, estudios realizados en aguas superficiales de los estados de Puebla y Veracruz, encontraron que las descargas de aguas residuales en los ríos de la zona, contaminan gravemente al provocar que se sobrepasen los límites permisibles para cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) en agua para uso y consumo humano[41]. En México no solo se ha investigado la contaminación de metales pesados en los recursos hídricos, también se han hecho estudios en flora y fauna, en este año en curso se ha encontrado arsénico, cadmio, y plomo en el zooplancton y

peces del río Tula [42]. Igualmente, se encontraron metales pesados en los residuos óseos de manatíes hallados muertos en las regiones costeras de los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche y la bahía de Chetumal[43]. En la tabla 1 se enumeran algunos de los casos reportados en aguas profundas, residuales, sedimentos, así como en aguas para consumo humano y en animales.

Año	Lugar	Metal	Referencia
<b>1998</b>	Sonora	As, Hg, Cd	[44]
	Coatzacoalcos, Veracruz	Zn, Pb	[45]
	Pacífico	Hg, Pb, Cr	[46]
	Golfo	Pb, Cd, Cr, Zn	[46]
<b>2003</b>	Michoacán	Pb	[47]
	San Luis	As, Pb	[48]
<b>2005</b>	Comarca, Lagunera	As	[49]
	Bahía Kunkaak, Sonora	Cd, Pb	[50]
<b>2006</b>	Baja California	Cd, Zn, Ni, Mn, Cu, Fe, Pb	[51]
	Bahía de Salina Cruz, Oaxaca	Pb	[52]
<b>2009</b>	Bahía de la Paz	Cd, Zn, Ni, P	[53]
	Golfo de California	Pb	[54]
	Río San Pedro	Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn	[55]
<b>2011</b>	Laguna de San Andrés	Cd	[56]
	San Pedro de Nayarit	Al,As,Ba,Cd,Ni,Cu,Cr,Fe,Hg,Pb,Zn	[57]
<b>2012</b>	Río Tigre	Pb, Cd	[58]
	Puebla, Veracruz	Cd,Hg, Pb	[41]
<b>2013</b>	Mar de Sonora	Ni, Cu, Zn, Se, Mg Cd	[59]
<b>2014</b>	Costa de Guerrero	Hg	[60]
	Golfo de California	Zn, Se,Cd	[61]
	Río Tlalnepantla	Fe, Al	[40]
	Valle del Mezquital, Hidalgo	MMHg,As,Pb,Ag,As,Cd,Cu,Hg,Pb,Zn	[62]
<b>2015</b>	Río San Lorenzo	Pb,Cr,Cu,Zn	[39]
	Bahía de Chetumal	Pb,Cr,Cu,Zn	[43]
<b>2016</b>	Río Tula	As,Cd, Pb	[42]

Tabla 1. Publicaciones sobre contaminación con metales pesados en México

### **2.3 Métodos de detección de metales pesados**

La detección de metales pesados se puede llevar a cabo mediante métodos confirmatorios o métodos por eliminación. Los métodos de confirmación se caracterizan al requerir bajos límites de contenido y por su alta precisión, pero en detrimento de lo anterior estos métodos requieren de instrumentos de laboratorio sofisticados y de personal altamente especializado, lo cual hace que el análisis de muestras contaminadas sea costoso[63]. Uno de los principales métodos utilizados en la detección de metales es la espectroscopia de absorción atómica (AAS), el cual se basa en la generación de átomos en estado basal y en la medición de la cantidad de energía absorbida por estos, la cual es directamente proporcional a la concentración del elemento en la muestra analizada[64]. La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es usualmente utilizada por su capacidad de discriminar isotopos y sus bajos límites de detección de metales; esta técnica deshidrata la muestra y excita los átomos presentes, y por último los ioniza al aplicar una corriente de radio frecuencia. El último paso en esta técnica es la espectrometría de masas (MS), la cual se basa en la separación de los núcleos atómicos en función de su relación carga-masa[65]. La espectroscopia de rayos x por fluorescencia (R-FS) es otra técnica utilizada en el análisis de contenido metálico en muestras contaminadas y se basa principalmente en la emisión de rayos X secundarios (fluorescentes) por parte de la muestra al ser bombardeada con rayos X de alta energía o rayos Gamma [66].

Por otra parte los métodos por eliminación (bioensayo, electroquímicos y ópticos), son altamente sensibles, el análisis requiere poco tiempo aunque la mayoría son cualitativos y su principal ventaja es su bajo coste[63]. Tomando en cuenta el creciente problema de la contaminación del agua, se presenta como necesario el desarrollo de métodos simples, rentables y de fácil acceso, que a su vez minimicen la utilización de personal altamente especializado; y que al mismo tiempo garanticen una detección eficiente. Los métodos por eliminación cumplen al pie de la letra los anteriores requerimientos, en caso de una respuesta positiva a la presencia de iones metálicos en una muestras, estos se pueden complementar, si así se requiere, con los métodos de confirmación para cuantificar con precisión el contenido de metales pesados. Los métodos ópticos son basados en la detección de una señal a través del cambio de color en la reacción del medio[67]. Los

métodos electroquímicos más conocidos son los potenciométricos, los cuales se basan en una respuesta electroquímica inducida por una diferencia de potencial[68].

Por otra parte, los bioensayos se caracterizan por la presencia de un biocomponente (anticuerpo, enzima, microorganismo, tejido, ácido nucleico) con alto nivel de especificidad, el cual reacciona a la presencia de un analito o sustrato en el medio[63].

Uno de los grandes desafíos de la investigación en detección de metales pesados en medios acuosos, es el diseño y la síntesis de receptores específicos con una fuerte capacidad de interacción con los metales. La interacción de iones con moléculas biológicas tales como proteínas, anticuerpos, o ácidos nucleicos ofrece en este campo notables ventajas en términos de selectividad y los límites de detección[69]. Entre los receptores biológicos utilizados para este propósito, podemos nombrar el uso del ADN para la detección de metales pesados; este método se basa principalmente en que mediante la hibridación del ADN el enlace timina - timina (T-T) puede unirse a cationes de metales pesados. En este sentido, se ha reportado que la capacidad quelante de las timinas es extremadamente selectiva hacia iones de mercurio ( $Hg^{2+}$ ), la cual logran mediante desajustes en el oligonucleótido para formar pares estables con estos iones metálicos[70]. En el 2009 Diesel y colaboradores, desarrollaron un bioensayo para la detección del arsénico en fuentes de agua naturales; dicho ensayo consistía en el uso de bacterias tales como *Escherichiacoli*, *Bacillussubtilis*, *Staphylococcusaureus* , y *hodopseudomonaspalustris*, las cuales en respuesta a la presencia de arsénico en el medio producen una proteína, cuyo monto o actividad es medida en el bioensayo [71].

### **2.3.1 Bioensayos para detección de iones metálicos.**

Los bioensayos más comunes para la detección de metales pesados han sido basados en ácidos nucleicos. Sin embargo se ha reportado en la literatura el uso de proteínas para la detección de iones metálicos, debido principalmente a que pueden ser utilizadas bajo diferentes principios de funcionamiento: tales como la medición de los cambios conformacionales de las proteínas cuando interactúa con un ion de metal pesado [72], cambios de fluorescencia[73], o la disminución en la actividad catalítica [74]. En lo que respecta a la detección de iones metálicos usando enzimas, que son moléculas de proteínas catalíticas, éstas disminuyen su actividad catalítica por uniones no covalentes o



por modificaciones covalentes. El uso de enzimas para la detección de iones metálicos ofrece significativas ventajas sobre los métodos tradicionales de detección: tales como una alta sensibilidad, selectividad y especificidad[75]. Aunque la mayoría de estos ensayos ambientales están dirigidos a compuestos orgánicos de bajo peso molecular, incluyendo los contaminantes industriales, pesticidas y herbicidas, esta técnica es teóricamente aplicable a cualquiera de los contaminantes para los que un anticuerpo específico pueda ser generado[76].

En la literatura podemos encontrar ensayos donde se utilizan enzimas para detectar la presencia de iones metálicos en solución, algunos ejemplos se presentan en la tabla 2.

Enzima	Estado	Contaminante	Año	Referencia
<b>Laccase</b>	Libre	Mn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> and Cr <sup>2+</sup> y componentes orgánicos	2005	[77]
<b>Urease</b>	Inmovilizada	Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , and Co <sup>2+</sup> .	2008	[78]
<b>Papaína</b>	Libre	Hg <sup>2+</sup>	2006	[76]
<b>Papaína</b>	Libre	Hg <sup>2+</sup>	2013	[79]
<b>Bromelina</b>	Libre	Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , xenobióticos	2008	[80]
<b>Trypsina</b>	Libre	Zn <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , xenobióticos	2009	[81]
<b>Molybdenumreducingenzyme</b>	Libre	Cu <sup>2+</sup>	2009	[74]
<b>Proteasas de Coriandrumsativum</b>	Libre	Hg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	2013	[82]

Tabla 2. Ensayos enzimáticos para detección de metales

Como se mencionó en el párrafo anterior los iones de metales pesados disminuyen o inhiben la actividad catalítica de las enzimas, por lo que se dice que actúan como inhibidores de enzimas. Todos los inhibidores enzimáticos tienen las mismas reglas de interacción en el medio de la reacción, por lo cual se puede tomar como una base para el desarrollo de ensayos enzimáticos para la detección de metales pesados, dicha inhibición es causada por unión del metal a un grupo funcional en el sitio activo de una enzima.

El objetivo de este trabajo de investigación es el desarrollo de un ensayo enzimático para la detección de iones de metales pesados mediante el uso de la sensibilidad del centro activo de la enzima, particularmente de la enzima papaína, hacia la presencia de iones metálicos en el medio de reacción. De igual manera, se pretende estabilizar la enzima utilizando un sistema de inmovilización en nanofibras poliméricas electrohiladas, con lo cual se busca

potencializar la detección de los iones de metales pesados presentes en el medio tomando ventaja de la elevada área superficial y porosidad de este soporte nanoestructurado. Es importante destacar que nuestro grupo de investigación ya ha publicado el desarrollo de este sistema de inmovilización de la enzima papaína utilizando nanofibras electrohiladas poliméricas para su encapsulación y posterior inmovilización utilizando glutaraldehído como agente entrecruzante [83]. Este sistema mejoró considerablemente las condiciones de operación bajo las cuales la enzima podía ser utilizada y posteriormente recuperada del medio de reacción. De igual manera se establecieron las bases para que esta enzima inmovilizada pudiera ser utilizada en aplicaciones tales como la que proponemos en esta tesis de investigación.

## **2.4 Enzimas**

Las enzimas son proteínas cuya función es actuar como catalizadores de reacciones bioquímicas asociadas con el correcto funcionamiento de los organismos vivos. Las enzimas funcionan como máquinas moleculares altamente especializadas capaces de romper, ensamblar, o transformar moléculas[84]. La parte de la estructura molecular de la enzima donde se lleva a cabo las reacciones químicas correspondientes a la catálisis se llama sitio activo. Este sitio activo es la región donde la enzima se combina con la molécula específica con la cual reacciona, llamada sustrato o analito. Cuando un sustrato y una enzima se enlazan, la distribución de los electrones de los enlaces químicos del sustrato cambian, lo que da origen a la reacción química que origina al producto; una vez que el producto es fabricado, la enzima se libera y se comienza a regenerar para otro ciclo de reacciones químicas. El sitio activo de una enzima es sumamente específico hacia un cierto tipo de molécula de sustrato[85]. Emil Fischer en 1894 sugirió que tanto la enzima como su correspondiente sustrato tienen formas geométricas específicas que se ajustan exactamente entre sí. Esta hipótesis recibió el nombre de mecanismo llave-candado (figura 5)[86]. En 1958 Daniel Koshland sugirió una ligera modificación de la hipótesis llave-candado, se basa en el principio de que las enzimas son flexibles, por lo tanto el sitio activo está cambiando su forma constantemente por sus interacciones con el sustrato; es decir, el sustrato no se une a un sitio activo como si fuera específicamente la forma correcta, más bien las cadenas laterales de aminoácidos del sitio activo se moldean en una posición

específica. Esta posición permite que la enzima inicie el proceso de catálisis, dicha teoría es llamada la teoría de ajuste inducido[87].

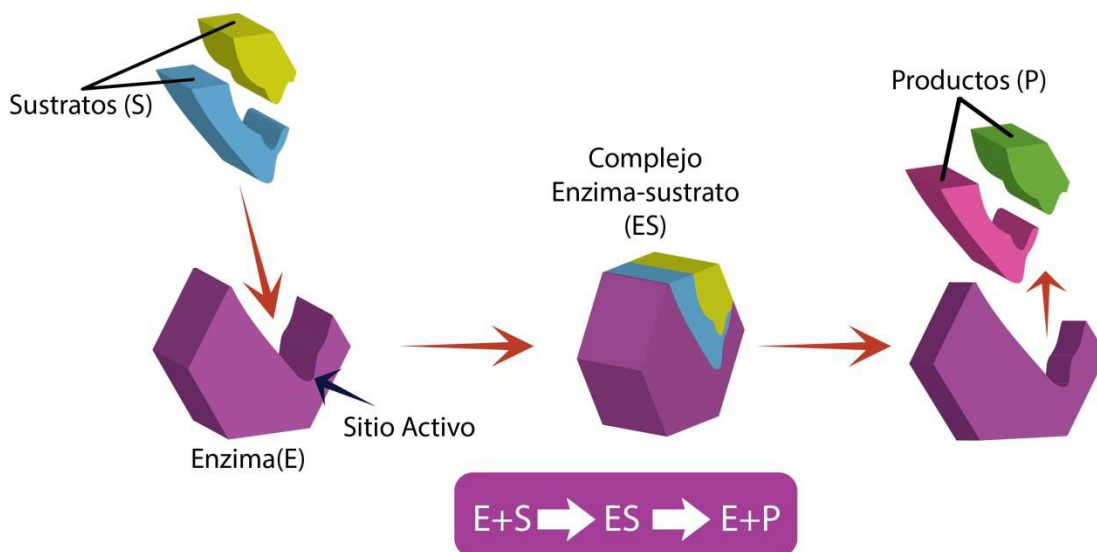


Fig. 5 Modelo llave-candado

Un gran número de enzimas han llegado a convertirse en herramientas indispensables en distintos sectores de la industria tales como el tratamiento de aguas, la industria alimenticia y el sector farmacéutico[88][89][90][91]. Con el surgimiento de la nanotecnología y de la mano de la biotecnología se ha desarrollado una herramienta con la cual se pueden minimizar los problemas que se presentan al extraer a las enzimas de su medio natural, la conservación de la actividad enzimática, la reutilización de la enzima, es decir recuperación del medio de reacción en un proceso industrial, ya que este origina un costo adicional [92]. Las exigencias actuales obligan a mejorar la utilización de enzimas y alargar su ciclo de vida útil, lo cual permitirá seguir utilizándolas de manera efectiva en los sectores industriales y de investigación científica en los que su uso se ha vuelto indispensable. Una excelente solución a este problema, es la inmovilización de enzimas en distintos tipos de matrices, la cual ofrece una opción para aumentar la disponibilidad de la enzima sobre el sustrato utilizado, y su reutilización durante un período mayor y bajo un rango amplio de valores de pH y temperatura.

#### 2.4.1 Inhibidores de enzimas

Acerca de la actividad enzimática podemos mencionar que esta puede ser mermada por distintos factores, uno de los más importantes es la temperatura. Si la temperatura es demasiado alta, la forma del sitio activo de una enzima se altera, lo que hace imposible que

el sustrato pueda encajar. Si la temperatura es demasiado baja, el sustrato no tiene suficiente energía para moverse al sitio activo. Por otro lado son generalmente inestables en medios orgánicos o en condiciones variantes, presión o rangos de pH extremos. De igual manera si la temperatura se eleva demasiado por tiempos prolongados, las enzimas, al igual que los demás tipos de proteínas pueden perder su estructura tridimensional y dejar de ser funcionales, es un proceso llamado desnaturalización. En ocasiones las enzimas pueden llegar a ser inhibidas por altas concentraciones de sustratos o productos, o mostrar una baja actividad y selectividad hacia sustratos que no le son naturales.

Los inhibidores enzimáticos pueden reducir o inhibir completamente la actividad catalítica de la enzima ya sea de manera reversible o permanente. El inhibidor puede modificar un aminoácido, o varias cadenas laterales indispensables para la correcta función catalítica de la enzima. La inhibición controlada de enzimas es ampliamente usada en la industria farmacéutica, donde la mayoría de los fármacos son diseñados para inhibir enzimas específicas; por ejemplo: el metotrexato fue usado inicialmente como parte de la quimioterapia en el tratamiento contra el cáncer, el cual trabaja inhibiendo selectivamente la síntesis de ADN de las células malignas. Los inhibidores enzimáticos se han utilizado de igual manera en analgésicos como la aspirina, naproxeno, ibuprofeno, etc.[93]. La clasificación común de los inhibidores enzimáticos está dividida en dos: inhibidores específicos y no específicos y esta inhibición puede ser reversible o irreversible.

**Los inhibidores irreversibles** no tienen relación estructural con el sustrato, se unen covalentemente con el sitio activo de la enzima y destruyen al grupo funcional esencial del sitio activo.

**La inhibición reversible** puede ser competitiva, no competitiva o acompetitiva con respecto a un sustrato particular. Con la reducción de la concentración de inhibidor, se regenera la actividad de la enzima debido a la asociación no covalente y el equilibrio reversible con la enzima.

El inhibidor competitivo está estructuralmente relacionado con el sustrato y se une de forma reversible con el sitio activo de la enzima ocupando de esta manera el sitio del sustrato, en otras palabras el inhibidor competitivo compite con el sustrato por el sitio activo. El inhibidor no competitivo no tiene una similitud estructural con el sustrato. Sin embargo, se puede ligar a la enzima libre mediante una unión lejos del sitio activo, lo cual

provoca una distorsión estructural de los sitios activos y alostéricos de la estructura tridimensional de la enzima y esto inactiva la catálisis. El aumento de sustrato hacia una concentración de saturación no revierte este tipo de inhibición, su reversión requiere de un tratamiento especial. El inhibidor acompetitivo (mixto) no tiene similitud estructural con el sustrato, pero se une tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. Su forma de unión no es mutuamente exclusiva con el sustrato y la presencia de un sustrato no tiene influencia en la capacidad de un inhibidor no competitivo para unirse a la enzima y viceversa. Sin embargo, su unión aunque lejos del sitio activo altera la conformación de la enzima y reduce su actividad catalítica debido a cambios en la naturaleza de los grupos catalíticos en el sitio activo. En la tabla 3 se resume las características de los diferentes tipos de inhibición reversible[94].

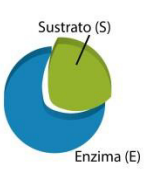
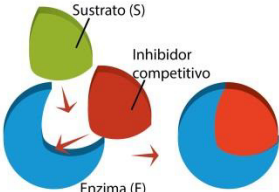
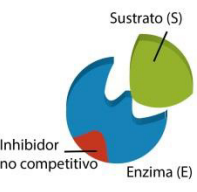
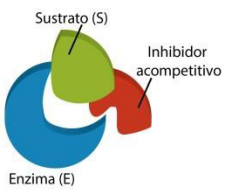
Unión normal	Inhibición Competitiva	Inhibición no competitiva	Inhibición acompetitiva
 <p>*El Sustrato se une al sitio activo. *Existe una reacción y se generan productos.</p>	 <p>*El inhibidor se une al sitio activo. *Compite con el sustrato para la unión. *La Unión es reversible incrementando la concentración del sustrato.</p>	 <p>*El inhibidor se une a la enzima. *Hay un cambio en la estructura conformacional de la enzima. *Impide que la enzima se una al sustrato. *El incrementando la concentración del sustrato no revierte la inhibición.</p>	 <p>*El inhibidor se al sustrato. *La unión sustrato-inhibidor impide la reacción en el sitio activo. *El incrementando la concentración del sustrato no revierte la inhibición.</p>

Tabla 3. Comparación de los diferentes tipos de inhibición reversible.

### 2.4.2 Inmovilización de enzimas

Una enzima inmovilizada se puede definir cuando estas se encuentran confinadas o localizadas en una cierta región definida del espacio y continúan con una determinada retención de su actividad catalítica[95]. Esta inmovilización se puede llevar a cabo por diferentes métodos, dependiendo de la naturaleza del receptor y la material que constituye la detección. Las ventajas de la inmovilización son: la fácil recuperación de la enzima, el aumento de su estabilidad en condiciones extremas, y la disminución del costo total del proceso, sin embargo pueden presentar algunas desventajas como: la pérdida parcial de la actividad catalítica, cambios en los parámetros de difusividad del analito hacia el centro activo y heterogeneidad del sistema[96].

Existen una amplia variedad de métodos de inmovilización, pero podemos mencionar cinco principales, los cuales se muestran en la figura 6 [97]. Estos métodos se clasifican como: métodos físicos (absorción, atrapamiento e inclusión en membranas) que se caracterizan por la fijación de la enzima utilizando fuerzas débiles como lo son las interacciones electrostáticas e interacciones proteína-proteína. Por otra parte tenemos los métodos químicos (unión covalente o reticulado) que involucran la formación de al menos un enlace covalente.

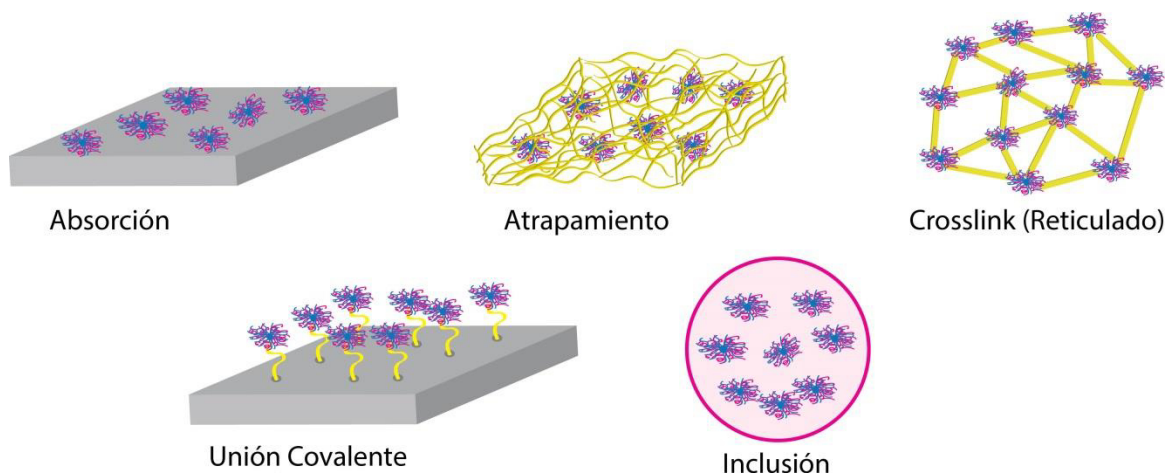


Fig. 6 Principales métodos de inmovilización

Debido a la amplia gama de características químicas de las enzimas, sustratos y de soportes disponibles para un sistema de inmovilización enzimático, se han realizados combinaciones de los distintos métodos de inmovilización para poder obtener condiciones óptimas condiciones para el funcionamiento catalítico de la enzima y preservar su estabilidad y durabilidad.

#### 2.4.2.1 Inmovilización de enzimas en nanoestructuras

Como se mencionó anteriormente las aplicaciones de las enzimas están limitadas por su inestabilidad una vez extraídas de su medio ambiente natural y su nula capacidad de reutilización, lo cual se logra controlar de forma efectiva mediante la inmovilización de la enzima. Sin embargo, cabe mencionar que la efectividad del método de inmovilización depende en gran manera de los materiales utilizados en el proceso de inmovilización. En este aspecto, las nanoestructuras cuentan con características únicas tales como una gran relación área-volumen, una elevada porosidad, superficies fácilmente modificables y alta transferencia de masa. Por las mencionadas características, diversas nanoestructuras se

han utilizado en la estabilización e inmovilización de enzimas; entre éstas podemos mencionar las nanopartículas, nanofibras, nanotubos, sílice mesoporosa, nanoestructuras en base en la técnica de sol-gel, entre otras[96]. Sin embargo, algunas de estas nanoestructuras muestran desventajas. Por ejemplo, la sílice mesoporosa y las nanoestructuras basadas en la técnica de sol-gel, confinan a las moléculas de enzima en su superficie interna, lo cual dificulta la interacción entre la enzima y el sustrato, llevando de esta manera a una disminución en la actividad de la enzima inmovilizada[96]. En este sentido, las nanofibras y los nanotubos no tienen este problema ya que las características de su nanoestructura provocan que disminuyan significativamente las limitaciones en la transferencia de masa al contar con una elevada porosidad, lo cual facilita el paso de las moléculas de sustrato hacia el sitio activo de la enzima inmovilizada; además como toda nanoestructura cuentan con la característica de una elevada relación área superficial contra volumen, lo cual favorece una mayor carga enzimática final[98]. Además las membranas de nanofibras son fácilmente recuperables del medio de reacción, por lo que pueden ser reutilizadas en reacciones subsecuentes, lo cual elimina el problema de recuperación que se presentaba en las nanopartículas por su tendencia a la dispersión[99]. Las nanofibras pueden ser sintetizadas a través de una variedad de procedimientos, entre los que se pueden mencionar: el auto-ensamblaje[100], síntesis por medio de un plantilla[101], separación de fases[102], estiramiento [103] y el electrohilado [104].

#### **2.4.2.1.1 Inmovilización de enzimas en nanofibras electrohiladas**

El método de electrohilado es el más utilizado para la síntesis de nanofibras poliméricas, sus diámetros varían desde 50nm hasta 500nm [105]. Esta técnica también ofrece la posibilidad de controlar el tamaño de los poros, la capacidad de controlar la composición de las nanofibras y mantener la característica principal de toda nanoestructura como lo es la alta relación superficie/volumen[106].

Enzima	Polímero utilizado	Año	Ref.
Glucanotransferasaciclo dextrina	Polyvinyl alcohol (pva)	2016	[107]
Laccase	Poliamida	2016	[108]
Papaína	Poly(vinyl alcohol)	2015	[83]
Tripsina	Tereftalato de polietileno (pet) y tres tipos de poli (ácido láctico)	2015	[109]
Aminoacilasa	Poly(vinyl alcohol)	2015	[110]
L-asparaginasa	Polianilina	2012	[111]
Lacasas	Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)	2012	[112]
Lipasa	Celulosa	2011	[113]
Lacasas	Ácido poliláctico, ácido poli-(láctico-co-glicólico)	2011	[114]
Celulasa	Óxido de polietileno	2011	[115]
B-glucosidasa	Poli (estireno), poli (estireno-co-anhídrido maleico)	2010	[116]
Acetilcolinesterasa	Poli (vinil alcohol)	2010	[117]
Superóxidodismutasa	Ácido poliláctico	2010	[118]

Tabla 4. Enzimas inmovilizadas usando técnica de electrohilado

En la tabla 4 se muestran un resumen de algunas enzimas que han sido inmovilizadas por electrohilado, a pesar de la variación de distintos factores tales como el tiempo, la temperatura y el pH, en todos los casos se ha reportado una notable mejoría en el desempeño de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima en solución. Lo anterior significa que la enzima inmovilizada conserva durante más tiempo su actividad catalítica en un amplio rango de valores de temperatura, pH y tiempo de almacenamiento. Los dos mecanismos más comunes mediante los cuales se logra la inmovilización y fijación de la enzima en las nanofibras poliméricas son: el atrapamiento de la enzima seguido de un proceso de entrecruzamiento o reticulado, o bien la funcionalización de las nanofibras seguido de un proceso de activación y la posterior unión de la enzima mediante un enlace covalente; la primera de estas opciones fue utilizada por nuestro grupo de trabajo para inmovilizar la enzima de la papaína[83]. Las nanofibras electrohiladas se emplean ampliamente en aplicaciones biomédicas, como matrices en la ingeniería de tejidos, como apósitos en la curación de herida, en la administración de fármacos, la filtración, como membrana de afinidad, en la inmovilización de las enzimas, implantes de injertos



vasculares de pequeño diámetro, asistencia sanitaria, biotecnología, ingeniería ambiental, defensa y seguridad, almacenamiento y la generación de energía. En la figura 7 se presenta un diagrama de las principales aplicaciones de las nanofibras electrohiladas[119][104][120][102][107].

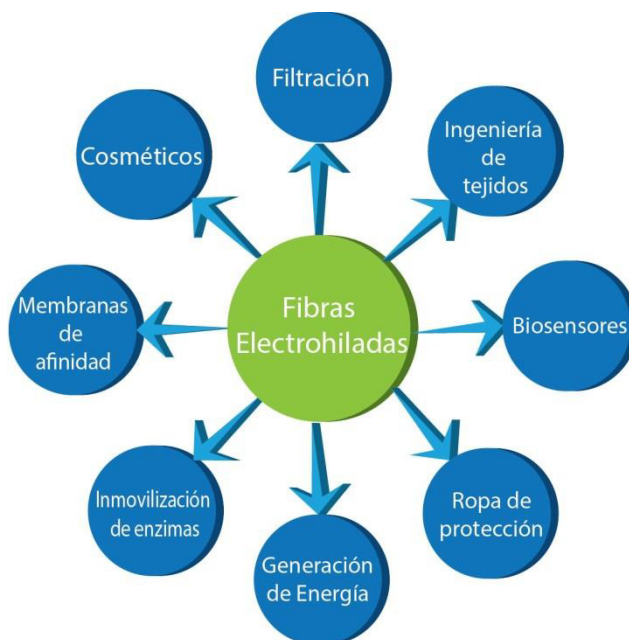


Fig. 7 Aplicaciones de las nanofibras electrohiladas

## 2.5 La enzima papaína

La papaína es una enzima cisteínica endopeptidasa (EC 3.4.22.2) extraída de la planta papaya *Carica* y es considerada como una enzima modelo de la familia de las cisteínas proteasas, en 1879 fue aislada por primera vez de la papaya *Carica* y también fue la primer proteasa cuya estructura cristalográfica fue esclarecida (figura 8)[121]. La papaína se compone de 212 aminoácidos con tres puentes di-sulfuros internos. Las proteasas cisteínicas requieren un ambiente reducido y ácido para ser activas. La actividad óptima de la papaína se produce a un pH de 5.8 a 7.5 y a una temperatura en el rango de 50 a 57 °C cuando la caseína se utiliza como el sustrato. La papaína es estable y activa por varios meses cuando se almacenan a 4° C. La disminución de la actividad durante el almacenamiento es debido a la oxidación del grupo tiol del sitio activo. Esta oxidación puede ser parcialmente revertida por reactivos tiol (cisteína, mercaptoetanol, dimercaptopropanol etc.)[122].

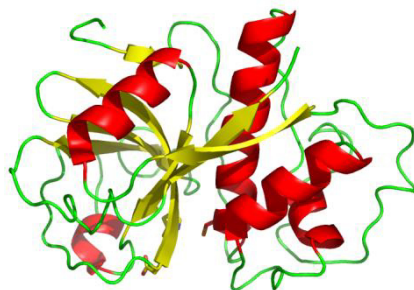


Fig. 8 Representación tridimensional de la estructura de la papaína[123].

### 2.5.1 Sitio Activo

La triada catalítica que forma el sitio activo de la papaína está formada entre la cadena lateral de cisteína 25, Histidina 159 y la cadena lateral de asparagina 175, dentro del surco se encuentra el grupo SH, cercano al grupo sulfhídrico se encuentra el anillo de imidazol de la histidina 159, el cual se encuentra unido a su vez a través de puentes de hidrogeno, con la cadena lateral de asparagina 175 (figura 9)[124]. La interacción entre enzima y sustrato ocurre en la superficie de la molécula de papaína en el surco donde encuentra el grupo SH; si este grupo se encuentra bloqueado por metales pesados, por agentes alquilantes o por formación disulfídica, la actividad catalítica de la enzima desaparece[122][125].

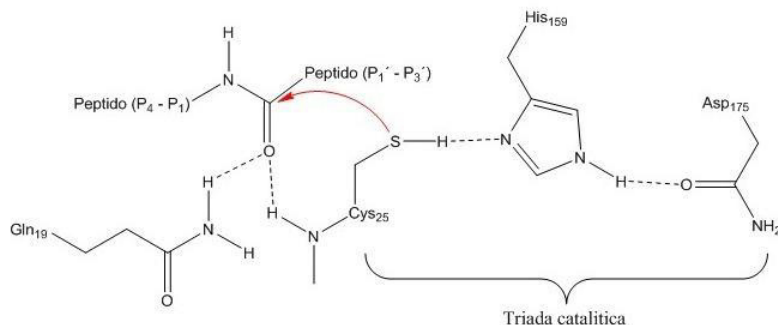


Fig. 9 Estructura del sitio activo de la papaína

La papaína hidroliza su sustrato en fragmentos peptídicos muy pequeños. Esta enzima necesita cisteína para activarse y realizar la hidrólisis. El pH óptimo es neutro, pero tolera variaciones entre 4 y 9,5. El rango de temperatura óptimo también oscila entre 5 °C y 66 °C[121]. La enzima papaína tiene importantes aplicaciones en la industria, tales como su amplio uso en la industria cárnica para el ablandamiento de carne, así como en la industria

cervecera donde es usada para evitar el enturbiamiento de la cerveza debido a bajas temperatura[121][126][127].

### **2.5.2 Métodos de inmovilización de la papaína en nanoestructuras**

En la literatura podemos encontrar publicaciones donde la enzima de la papaína ha sido inmovilizada en nanoestructuras por ejemplo en la sílice mesoporosa donde la papaína inmovilizada exhibe una excelente estabilidad a un pH de 5 [128]. De igual manera, la papaína también ha sido inmovilizada en nanobastones de oro donde mantuvo una alta actividad catalítica incluso después de usarla continuamente [129]. Por otra parte, esta enzima ha sido utilizada en nanopartículas magnéticas, donde se reportó que mejoró su tolerancia a las variaciones en diferentes rangos de pH y temperatura, obteniendo una mejor estabilidad de almacenamiento y una buena capacidad de reutilización. Este mismo método se ha complementado con la adhesión de las nanopartículas de plata en conjunto con la enzima papaína a esferas de sílice utilizando la interacción electrostática. Una técnica recientemente utilizada por su relativa sencillez es la inmovilización en nanofibras electrohiladas donde se aprovecha la elevada relación área/ volumen de estos materiales para incrementar la carga de enzima inmovilizada; esta técnica tiene como ventaja respecto a las otras que es una técnica de producción de nanoestructuras en un solo paso, además que permite que la enzima conserve su actividad catalítica después del proceso de encapsulación[83].

### **2.5.3 Papaína utilizada en ensayos enzimáticos de detección de iones metálicos**

En la literatura hay reportes del uso de la enzima papaína en ensayos para detección de metales, en los cuales se ha encontrado que su actividad enzimática es sensible a la presencia de iones metálicos en el medio de reacción. Shukor y colaboradores utilizaron la enzima papaína en solución para la detección de iones metálicos contaminantes tales como  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y xenobióticos en aguas de Malasia; en este caso la enzima dio una respuesta toxicológica positiva, es decir hubo una disminución de la actividad catalítica enzimática [76]. Posteriormente, Wahab et al. trabajaron en la detección de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) en muestras de diferentes productos herbales. Las muestras en las que se detectó contaminación, fueron enviadas al laboratorio para usar métodos confirmativos y validar la respuesta de la enzima. Al final se comprobó que la enzima muestra una inhibición de su actividad ante presencia de iones mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ )[79]. Con la premisa de que en diversas

situaciones reales se pueden encontrar distintos tipos de iones metálicos en aguas contaminadas, Xue-Ying Liuy colaboradores estudiaron la influencia y la interacción de los iones metálicos  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  sobre la actividad catalítica de la enzima papaína. En este estudio se encontró que existe una interacción fuerte de inhibición competitiva combinatoria entre los iones  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  en las muestras analizadas [130]. Tomando en cuenta los ejemplos anteriores en la literatura, podemos afirmar que existe una base científica que sustenta a la enzima papaína como una entidad eficiente en la detección de metales pesados y contaminantes en muestras acuosas contaminadas.

## **2.6 Motivación o justificación**

La contaminación de los recursos hídricos por metales pesados es un problema que se ha ido incrementando debido al crecimiento demográfico y al aumento de actividades antropogénicas, esto ha desencadenado uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, debido a que no son biodegradables pueden acumularse en el medio ambiente. La población tiene fácil acceso a este tipo de contaminantes por medio de la cadena alimenticia, o bien por la ingesta directa de aguas contaminadas provocando daños muchas veces irreversibles en la salud. La detección de dichos contaminantes suele ser costoso, requiere un tiempo de procesamiento de datos relativamente largo y de sofisticado análisis, por lo cual es necesario el desarrollo de métodos para detección de iones metálicos en aguas a bajo costo, amigables para el ambiente y con métodos relativamente simples para evitar el consumo de agua con una calidad deficiente.

## **2.7 Hipótesis**

La enzima papaína encapsulada e inmovilizada en nanofibras electrohiladas poliméricas es un material efectivo en la creación de un ensayo enzimático para la detección de iones metálicos en medios acuosos.

## **2.8 Objetivo general**

La detección de contaminantes, tales como iones metálicos, en medios acuosos mediante un ensayo enzimático usando la enzima papaína inmovilizada en nanofibras electrohiladas de polivinilalcohol (PVA). Este ensayo tendrá potencial aplicación en la detección de la presencia de iones metálicos en aguas contaminadas por residuos industriales o naturales.

### 2.8.1 Objetivos específicos

- Llevar a cabo la inmovilización de la enzima papaína en nanofibras poliméricas electrohiladas de PVA siguiendo el método reportado por nuestro grupo de investigación.
- Evaluar la actividad catalítica de la enzima inmovilizada bajo distintos ambientes de reacción para encontrar el más adecuado para llevar a cabo el ensayo de detección de iones metálicos.
- Evaluar el comportamiento de la actividad enzimática de la papaína libre en solución en la presencia de los diferentes iones metálicos propuestos y medir su grado de inhibición enzimática.
- Realizar pruebas de actividad enzimática con la enzima inmovilizada en nanofibras electrohiladas de PVA con la presencia de diferentes iones metálicos en el medio de reacción.
- Llevar a cabo el análisis de datos de los experimentos de inhibición y tratarlos bajo diferentes modelos matemáticos para obtener el correspondiente factor de correlación ( $R^2$ ).
- Evaluar el grado de interferencia de interferentes tipo xenobióticos en la interacción entre la concentración de distintos iones metálicos y el centro activo de la enzima inmovilizada.

### Referencias

- [1] A. Br.,utigam, "The freshwater crisis: Basic elements," in *World Conservation*, vol. 30, no. 2, 1999, pp. 45–113.
- [2] *World Health Statistics 2015*. 2015.
- [3] CONAGUA, "Estadísticas del Agua en México," *Uso Del Agua*, vol. Capítulo 3, p. 14, 2011.
- [4] M. D. DeLong, *Rivers of North America*. 2005.
- [5] I. S. Cohen, Ú. O. Spring, and G. D. Padilla, "Water Resources in Mexico," *Water Resour. Mex. Scarcity, Degrad. Stress. Conflicts, Manag. Policy*, vol. 7, pp. 39–49, 2011.
- [6] C. M. Lewandowski, N. Co-investigator, and C. M. Lewandowski, *Water Resources in Mexico*, vol. 7. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [7] W. Schwartz, "G. EVELYN HUTCHINSON, A Treatise on Limnology, Vol. I, Part: 1 Geography and Physics of Lakes. XIV, 540 S., 154 Abb., 63 Tab., 11 Tafeln. Vol. I, Part 2: Chemistry of Lakes. XIV, 474 S., 74 Abb., 69 Tab. (Verbesserter Neudruck der Ausgabe von 1957). New Y," *Z. Allg. Mikrobiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 256–257, 1977.
- [8] R. Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, "Heavy metals and living systems: An overview," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 43(3), p. 246–253., 2011.
- [9] S. S. Ahmad, M. R. Azim, M. Bilal, Q. Mahmood, and A. Rashid, "Current Status of Toxic Metals Addition to Environment and Its Consequences," in *The Plant Family Brassicaceae*, vol. 21, 2012, pp. 35–69.

- [10] H. Ali, E. Khan, and M. A. Sajad, "Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications," *Chemosphere*, vol. 91, no. 7, pp. 869–881, 2013.
- [11] J. O. Nriagu, "The rise and fall of leaded gasoline," *Sci. Total Environ.*, vol. 92, pp. 13–28, 1990.
- [12] R. a. Wuana and F. E. Okieimen, "Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation," *ISRN Ecol.*, vol. 2011, pp. 1–20, 2011.
- [13] N. C. Brady and R. R. Weil, *The nature and properties of soils*, vol. 13, no. Ed. 11. 2002.
- [14] G. Bánfalvi, *Heavy metals, trace elements and their cellular effects*. 2011.
- [15] J. W. More and R. S., *Heavy Metal in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment*. 1984.
- [16] Ministerio de Medio Ambiente de Japón, "Enseñanzas de la Enfermedad de Minamata y el Manejo del Mercurio en Japón," *Div. la Salud y Segur. Medioambient. Dep. Salud Ambient. Minist. del Medio Ambient. Japón*, 2012.
- [17] P. L. Smedley, "Chapter 7 Arsenic in groundwater – south and east Asia," pp. 180–209, 2003.
- [18] U. K. Chowdhury, B. K. Biswas, T. R. Chowdhury, G. Samanta, B. K. Mandal, G. C. Basu, C. R. Chanda, D. Lodh, K. C. Saha, S. K. Mukherjee, S. Roy, S. Kabir, Q. Quamruzzaman, and D. Chakraborti, "Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India," *Environ. Health Perspect.*, vol. 108, no. 5, pp. 393–397, 2000.
- [19] S. S. Afzal Hossain, M. Fazle Rabbi, Abdur Rahman Abid, "Arsenic Problem in Groundwater, a Growing Threat to Public Health in Bangladesh: An Overall Perspective and Management Modelling Approach," in *Groundwater Updates*, 2000, pp. 473–474.
- [20] L. Rodríguez-Lado, G. Sun, M. Berg, Q. Zhang, H. Xue, Q. Zheng, and C. A. Johnson, "Groundwater Arsenic Contamination Throughout China," *Science (80-. )*, vol. 341, no. 6148, pp. 866–868, 2013.
- [21] † Michael Berg \*, ‡ Hong Con Tran, ‡ Thi Chuyen Nguyen, ‡ Hung Viet Pham, † Roland Schertenleib, and and Walter Giger†, "Arsenic Contamination of Groundwater and Drinking Water in Vietnam: A Human Health Threat," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, no. 13, pp. 2621–2626, 2001.
- [22] C.-H. Tseng, "An overview on peripheral vascular disease in blackfoot disease-hyperendemic villages in Taiwan.," *Angiology*, vol. 53, no. 5, pp. 529–537, 2002.
- [23] W. P. Tseng, "Effects and dose–response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic," *Env. Heal. Perspect.*, vol. 19, pp. 109–119, 1977.
- [24] C. J. Chen, Y. C. Chuang, T. M. Lin, and H. Y. Wu, "Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: High-arsenic artesian well water and cancers," *Cancer Res.*, vol. 45, no. 11 II, pp. 5895–5899, 1985.
- [25] C. Puthiyasekar, M. a Neelakantan, and S. Poongothai, "Heavy metal contamination in bore water due to industrial pollution and polluted and non polluted sea water intrusion in Thoothukudi and Tirunelveli of South Tamil Nadu, India.," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 85, no. 6, pp. 598–601, 2010.
- [26] A. Waseem, J. Arshad, F. Iqbal, A. Sajjad, Z. Mehmood, and G. Murtaza, "Pollution Status of Pakistan: A Retrospective Review on Heavy Metal Contamination of Water, Soil, and Vegetables," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–29, 2014.
- [27] J. E. Bunnell, R. B. Finkelman, J. A. Centeno, and O. Selinus, "Medical Geology: A globally emerging discipline," *Geologica Acta*, vol. 5, no. 3. pp. 273–281, 2007.
- [28] J. Bundschuh, A. P. Carrera, and M. Litter, "Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana," ... *Iberoam. Cienc. y ...*, 2008.
- [29] D. L. López, J. Bundschuh, P. Birkle, M. A. Armienta, L. Cumbal, O. Sracek, L. Cornejo, and M. Ormachea, "Volcanic arsenic and boron pollution of Ilopango lake," in *Geogenic Arsenic in Groundwater of Latin America*, 2008, pp. 129–143.
- [30] D. L. López, J. Bundschuh, P. Birkle, M. A. Armienta, L. Cumbal, O. Sracek, L. Cornejo, and M. Ormachea, "Arsenic in volcanic geothermal fluids of Latin America.," *Sci. Total Environ.*, vol. 429, pp. 57–75, 2012.
- [31] B. R. Figueiredo, M. I. Litter, C. R. Silva, N. Mañay, S. C. Londono, A. M. Rojas, C. Garzón, T. Tosiani, G. M. Di Giulio, E. M. De Capitani, Â. J. Dos Anjos, R. S. Angélica, M. C. Morita, M. M. B. Paoliello, F. G. Cunha, A. M. Sakuma, and O. A. Licht, "Medical Geology Studies in South America," in *Medical Geology*, 2010.

- [32] M. C. Silva-Forsberg, B. R. Forsberg, and V. K. Zeidemann, "Mercury Contamination in Humans Linked to River Chemistry in the Amazon Basin," *Ambio*, vol. 28, pp. 519–521, 1999.
- [33] O. Malm, "Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon.," *Environ. Res.*, vol. 77, no. 2, pp. 73–8, 1998.
- [34] A. C. Barbosa, S. R. L. Silva, and J. G. Dórea, "Concentration of mercury in hair of indigenous mothers and infants from the Amazon basin," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 34, no. 1, pp. 100–105, 1998.
- [35] A. C. Barbosa, A. M. Garcia, and J. R. De Souza, "Mercury contamination in hair of riverine populations of Apiacas reserve in the Brazilian Amazon," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 97, no. 1–2, pp. 1–8, 1997.
- [36] J. E. M. Beurskens, G. A. J. Mol, H. L. Barreveld, B. van Munster, and H. J. Winkels, "Geochronology of priority pollutants in a sedimentation area of the rhine river," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 12, no. 9, pp. 1549–1566, 1993.
- [37] H. J. Winkels, J. P. M. Vink, J. E. M. Beurskens, and S. B. Kroonenberg, "Distribution and geochronology of priority pollutants in a large sedimentation area, River Rhine, The Netherlands," *Appl. Geochemistry*, vol. 8, no. 2, pp. 95–101, 1993.
- [38] T. Hamers, J. H. Kamstra, J. van Gils, M. C. Kotte, and A. G. van Hattum, "The influence of extreme river discharge conditions on the quality of suspended particulate matter in Rivers Meuse and Rhine (The Netherlands)," *Environ. Res.*, vol. 143, pp. 241–255, 2015.
- [39] F. Paez-Osuna, H. Bojorquez-Leyva, M. Berges-Tiznado, O. A. Rubio-Hernandez, J. F. Fierro-Sanudo, J. Ramirez-Rochin, and J. A. Leon-Canedo, "Heavy metals in waters and suspended sediments affected by a mine tailing spill in the upper San Lorenzo River, Northwestern Mexico.," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 94, no. 5, pp. 583–588, 2015.
- [40] E. D. González-González, L. M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, P. Vieyra-Reyes, H. Islas-Flores, S. García-Medina, J. M. Jiménez-Vargas, C. Razo-Estrada, and R. Pérez-Pastén, "Metals and Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals Drugs Present in Water from Madín Reservoir (Mexico) Induce Oxidative Stress in Gill, Blood, and Muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*)," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 67, no. 2, pp. 281–295, 2014.
- [41] Ó. Raúl, M. -Villa, M. Ortega-Escobar, C. Ramírez-Ayala, E. Uscanga-Mortera, R. Ramos-Bello, Y. Amada, and L. Reyes-Ortigoza, "METALES PESADOS TOTALES Y ARSÉNICO EN EL AGUA PARA RIEGO DE PUEBLA Y VERACRUZ, MÉXICO," *Rev. Int. Contam. Ambie*, vol. 28, no. 1, pp. 39–48, 2012.
- [42] I. Rubio-Franchini, M. López-Hernández, M. G. Ramos-Espinosa, and R. Rico-Martínez, "Bioaccumulation of Metals Arsenic, Cadmium, and Lead in Zooplankton and Fishes from the Tula River Watershed, Mexico," *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 227, no. 1, p. 5, 2016.
- [43] A. G. Romero-Calderón, B. Morales-Vela, R. Rosiles-Martínez, L. D. Olivera-Gómez, and A. Delgado-Estrella, "Metals in Bone Tissue of Antillean Manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, pp. 9–14, 2015.
- [44] C. Jane Wyatt, "Incidence of Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern Mexico," *Environ. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 114–119, 1998.
- [45] L. Rosales-Hoz and a. Carranza-Edwards, "Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos River, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 60, pp. 553–561, 1998.
- [46] S. F. Villanueva and A. V. Botello, "Metal pollution in coastal areas of Mexico.," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 157, pp. 53–94, 1998.
- [47] R. Iturbe, R. M. Flores, and L. G. Torres, "Soil and water contamination levels in an out-of-service oil distribution and storage station in Michoacan, Mexico," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 146, pp. 261–281, 2003.
- [48] I. Razo, L. Carrizales, J. Castro, F. Díaz-Barriga, and M. Monroy, "Arsenic and Heavy Metal Pollution of Soil, Water and Sediments in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico," *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 152, no. 1–4, pp. 129–152, 2003.
- [49] J. R. Parga, D. L. Cocke, J. L. Valenzuela, J. a. Gomes, M. Kesmez, G. Irwin, H. Moreno, and M. Weir, "Arsenic removal via electrocoagulation from heavy metal contaminated groundwater in la Comarca Lagunera Mexico," *J. Hazard. Mater.*, vol.

- 124, no. 1–3, pp. 247–254, 2005.
- [50] J. García-Hernández, L. García-Rico, M. E. Jara-Marini, R. Barraza-Guardado, and A. Hudson Weaver, “Concentrations of heavy metals in sediment and organisms during a harmful algal bloom (HAB) at Kun Kaak Bay, Sonora, Mexico,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 50, no. 7, pp. 733–9, 2005.
- [51] S. C. Gardner, S. L. Fitzgerald, B. A. Vargas, and L. M. Rodríguez, “Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California Peninsula, Mexico,” *Biomaterials*, vol. 19, no. 1, pp. 91–99, 2006.
- [52] C. González-Macías, I. Schifter, D. B. Lluch-Cota, L. Méndez-Rodríguez, and S. Hernández-Vázquez, “Distribution, enrichment and accumulation of heavy metals in coastal sediments of Salina Cruz Bay, México,” *Environ. Monit. Assess.*, vol. 118, pp. 211–230, 2006.
- [53] N. Cantú-Medellín, N. O. Olguín-Monroy, L. C. Méndez-Rodríguez, and T. Zenteno-Savín, “Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico,” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 56, no. 1, pp. 60–6, 2009.
- [54] L. Cadena-Cárdenas, L. Méndez-Rodríguez, T. Zenteno-Savín, J. García-Hernández, and B. Acosta-Vargas, “Heavy metal levels in Marine Mollusks from areas with, or without, mining activities along the Gulf of California, Mexico,” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 57, no. 1, pp. 96–102, 2009.
- [55] A. Gómez-Alvarez, D. Meza-Figueroa, A. I. Villalba-Atondo, J. L. Valenzuela-García, J. Ramírez-Hernández, and J. Almendariz-Tapia, “Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993–2005), Mexico-US border,” *Environ. Geol.*, vol. 57, pp. 1469–1479, 2009.
- [56] M. De La Luz Vázquez-Sauceda, G. Aguirre-Guzmán, J. G. Sánchez-Martínez, and R. Pérez-Castañeda, “Cadmium, lead and zinc concentrations in water, sediment and oyster (*Crassostrea virginica*) of San Andres Lagoon, Mexico,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 86, no. 4, pp. 410–414, 2011.
- [57] M. R. Mayorquín, “Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de una hidroeléctrica (P.H. Las Cruces) en Nayarit, México,” p. 168, 2011.
- [58] M. De La Luz Vázquez-Sauceda, R. Pérez-Castañeda, J. G. Sánchez-Martínez, and G. Aguirre-Guzmán, “Cadmium and lead levels along the estuarine ecosystem of Tigre River-San Andres Lagoon, Tamaulipas, Mexico,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 89, no. 4, pp. 782–785, 2012.
- [59] C. P. Ley-Quinónez, A. A. Zavala-Norzagay, J. G. Réndon-Maldonado, T. L. Espinosa-Carreón, A. Canizales-Román, D. C. Escobedo-Urías, M. L. Leal-Acosta, C. E. Hart, and A. A. Aguirre, “Selected Heavy Metals and Selenium in the Blood of Black Sea Turtle (*Chelonia mydas agassizii*) from Sonora, Mexico,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 91, no. 6, pp. 645–651, 2013.
- [60] P. Spanopoulos-Zarco, J. Ruelas-Inzunza, M. Meza-Montenegro, K. Osuna-Sánchez, and F. Amezcua-Martínez, “Health risk assessment from mercury levels in bycatch fish species from the coasts of Guerrero, Mexico (Eastern Pacific),” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 93, no. 3, pp. 334–8, 2014.
- [61] A. A. Zavala-Norzagay, C. P. Ley-Quinónez, T. L. Espinosa-Carreón, A. Canizales-Román, C. E. Hart, and A. A. Aguirre, “Trace Elements in Blood of Sea Turtles *Lepidochelys olivacea* in the Gulf of California, Mexico,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 93, no. 5, pp. 536–541, 2014.
- [62] S. Guéron, C. Duwig, B. L. Prado, D. Point, M. G. Flores, and C. Siebe, “(Methyl)Mercury, Arsenic, and Lead Contamination of the World’s Largest Wastewater Irrigation System: the Mezquital Valley (Hidalgo State—Mexico),” *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 225, no. 8, p. 2045, 2014.
- [63] F. Arduini and G. Palleschi, *4 - Screening and confirmatory methods for the detection of heavy metals in foods*. Woodhead Publishing Limited, 2013.
- [64] NMX-AA-051-SCFI-2001, “Análisis De Agua - Determinación De Metales Por Absorción Atómica En Aguas Naturales , Potables , Residuales Y Residuales Tratadas - Método De Prueba ( Cancela a La Nmx-Aa-051-1981 ) Water Analisis - Determination of Metals By Atomic Absorption in Natural,” pp. 1–47, 2001.



- [65] G. Plascencia, "Espectrometría de masas," pp. 1–40, 2003.
- [66] D. Martínez B., a. J. Barón González, and O. D. Gil Novoa, "Espectrometría de fluorescencia de rayos X," *Rev. la Soc. Colomb. Física*, vol. 38, no. 2, pp. 790–793, 2006.
- [67] G. Aragay and A. Merkoç, "Recent Trends in Macro-, Micro-, and Nanomaterial-Based Tools and Strategies for Heavy-Metal Detection," pp. 3433–3458, 2011.
- [68] A. Mimendia, A. Legin, A. Merkoç, and M. del Valle, "Use of Sequential Injection Analysis to construct a potentiometric electronic tongue: Application to the multidetermination of heavy metals," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 146, no. 2, pp. 420–426, 2010.
- [69] N. Verma and M. Singh, "Biosensors for heavy metals," *BioMetals*, vol. 18, no. 2, pp. 121–129, 2005.
- [70] Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, and T. Machinami, "Mercury II -Mediated Formation of Thymine - Hg II - Thymine Base Pairs in DNA Duplexes," pp. 2172–2173, 2006.
- [71] E. Diesel, M. Schreiber, and J. R. Van Der Meer, "Development of bacteria-based bioassays for arsenic detection in natural waters," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, no. 3, pp. 687–693, 2009.
- [72] I. Bontidean, C. Berggren, G. Johansson, E. Csöregi, B. Mattiasson, J. R. Lloyd, K. J. Jakeman, and N. L. Brown, "Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 19, pp. 4162–4169, 1998.
- [73] P. Chen, B. Greenberg, S. Taghavi, C. Romano, D. Van Der Lelie, and C. He, "An exceptionally selective lead(II)-regulatory protein from *Ralstonia metallidurans*: Development of a fluorescent lead(II) probe," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 18, pp. 2715–2719, 2005.
- [74] M. Y. Shukor, N. A. Bakar, A. R. Othman, I. Yunus, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "Development of an inhibitive enzyme assay for copper," *J. Environ. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 39–44, 2009.
- [75] X. Zhu, L. Xu, Y. Lou, H. Yu, X. Li, D. A. Blake, and F. Liu, "Preparation of specific monoclonal antibodies (MAbs) against heavy metals: MAbs that recognize chelated cadmium ions," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 19, pp. 7648–7653, 2007.
- [76] Y. Shukor, N. A. Baharom, F. A. Rahman, M. P. Abdullah, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "Development of a heavy metals enzymatic-based assay using papain," *Anal. Chim. Acta*, vol. 566, no. 2, pp. 283–289, 2006.
- [77] M. Lorenzo, D. Moldes, S. Rodríguez Couto, and M. A. Sanromán, "Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds," *Chemosphere*, vol. 60, no. 8, pp. 1124–1128, 2005.
- [78] O. Prakash, M. Talat, S. H. Hasan, and R. K. Pandey, "Enzymatic detection of heavy metal ions in aqueous solution from vegetable wastes by immobilizing pumpkin (*Cucumis melo*) urease in calcium alginate beads," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 13, no. 2, pp. 210–216, 2008.
- [79] N. Wahab, SMA and Gunasekaran, B and Shahrudin, NA and Johari, WLW and Halmi, MIE and Said, NAM and Shukor, MY Abd and Masdor, "A novel method for the determination of mercury in herbal preparation using an inhibitive assay based on the protease papain," *J. Env. Microbiol Toxicol*, vol. 1(1), pp. 1–4, 2013.
- [80] M. Y. Shukor, N. Masdor, N. A. Baharom, J. A. Jamal, M. P. A. Abdullah, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 144, no. 3, pp. 283–291, 2008.
- [81] M. Y. Shukor, N. A. Baharom, N. A. Masdor, M. P. A. Abdullah, N. A. Shamaan, J. A. Jamal, and M. A. Syed, "The development of an inhibitive determination method for zinc using a serine protease," *J. Environ. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 17–22, 2009.
- [82] G. Baskaran, N. A. Masdor, M. A. Syed, and M. Y. Shukor, "An inhibitive enzyme assay to detect mercury and zinc using protease from *coriandrum sativum*," *Sci. World J.*, vol. 2013, 2013.
- [83] I. E. Moreno-Cortez, J. Romero-García, V. González-González, D. I. García-Gutiérrez, M. A. Garza-Navarro, and R. Cruz-Silva, "Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of {PVA} cross-linked with

- glutaraldehyde vapor," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 52, pp. 306–314, 2015.
- [84] B. Brena, P. Gonzalez-Pombo, and F. Batista-Viera, "Immobilization of enzymes: A literature survey," *Immobil. Enzym. Cells Third Ed.*, vol. 1051, pp. 15–31, 2013.
  - [85] M. V. Vol'kenshtein, *Enzyme Physics*, vol. 1. Boston, MA: Springer US, 1969.
  - [86] E. Fischer, "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme," *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 27, pp. 2985–2993, 1894.
  - [87] D. E. Koshland, "The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 33, no. 2324, pp. 2375–2378, 1995.
  - [88] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, and G. Bohlmann, "Industrial use of immobilized enzymes," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6437–6474, 2013.
  - [89] I. Benucci, M. Esti, and K. Liburdi, "Effect of free and immobilised stem bromelain on protein haze in white wine," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 20, no. 3, pp. 347–352, 2014.
  - [90] A. Kaur and J. N. Chakraborty, "Controlled eco-friendly shrink-resist finishing of wool using bromelain," *J. Clean. Prod.*, Aug. 2015.
  - [91] H. R. Maurer, "Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 9, pp. 1234–1245, 2001.
  - [92] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2013.
  - [93] R. Sharma, *Enzyme Inhibition and Bioapplications*. InTech, 2012.
  - [94] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, and G. Palleschi, "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 8, pp. 1405–1423, 2006.
  - [95] C. Spahn and S. D. Minter, "Enzyme Immobilization in Biotechnology," *Recent Patents Eng.*, vol. 2, no. 3, pp. 195–200, 2008.
  - [96] J. Kim, J. W. Grate, and P. Wang, "Nanostructures for enzyme stabilization," *Chemical Engineering Science*, vol. 61, no. 3, pp. 1017–1026, 2006.
  - [97] I. Chibata, T. Tosa, T. Mori, T. Watanabe, and N. Sakata, "Immobilized tannin - a novel adsorbent for protein and metal ion," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 8, no. 3, pp. 130–136, 1986.
  - [98] T. Xie, A. Wang, L. Huang, H. Li, Z. Chen, Q. Wang, and X. Yin, "Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization," *African J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 19, pp. 4724–4733, 2009.
  - [99] I. Kim, S. Choi, S. Kim, and J. Jang, *Smart Sensors for Health and Environment Monitoring*. 2015.
  - [100] E. L. Rexeisen, W. Fan, T. O. Pangburn, R. R. Taribagil, F. S. Bates, T. P. Lodge, M. Tsapatsis, and E. Kokkoli, "Self-Assembly of Fibronectin Mimetic Peptide-Amphiphile Nanofibers," *Langmuir*, vol. 26, no. 3, pp. 1953–1959, 2010.
  - [101] † Guicun Li\* and Zhikun Zhang, "Synthesis of Dendritic Polyaniline Nanofibers in a Surfactant Gel," *Macromolecules*, vol. 37, no. 8, pp. 2683–2685, 2004.
  - [102] X. Liu and P. X. Ma, "Gelatin Scaffolds," *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4094–4103, 2010.
  - [103] X. B. Xing, Y. Q. Wang, and B. J. Li, "Nanofiber drawing and nanodevice assembly in poly(trimethylene terephthalate)," *Opt. Express*, vol. 16, no. 14, pp. 10815–10822, 2008.
  - [104] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, "Electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, 2005.
  - [105] D. H. Reneker and I. Chun, "Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning," *Nanotechnology*, vol. 7, no. 3, pp. 216–223, 1999.
  - [106] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
  - [107] S. Saallah, M. N. Naim, I. W. Lenggoro, M. N. Mokhtar, N. F. A. Bakar, and M. Gen, "Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning," *Biotechnol. Reports*, vol. 10, pp. 44–48,

- 2016.
- [108] M. Maryšková, I. Ardao, C. A. García-González, L. Martinová, J. Rotková, and A. Ševců, "Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 89, pp. 31–38, 2016.
  - [109] T. R. Silva, D. P. Rodrigues, J. M. S. Rocha, M. H. Gil, S. C. S. Pinto, J. A. Lopes-da-Silva, and A. J. Guiomar, "Immobilization of trypsin onto poly(ethylene terephthalate)/poly(lactic acid) nonwoven nanofiber mats," *Biochem. Eng. J.*, vol. 104, pp. 48–56, 2015.
  - [110] J. Li, Z. Zhao, T. Mo, L. Wang, and P. Li, "Immobilization of aminoacylase on electrospun nanofibrous membrane for the resolution of dl-theanine," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 116, pp. 24–28, 2015.
  - [111] S. Ghosh, S. R. Chaganti, and R. S. Prakasham, "Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme l-asparaginase," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 74, no. 1–2, pp. 132–137, 2012.
  - [112] P. Sathishkumar, J. C. Chae, A. R. Unnithan, T. Palvannan, H. Y. Kim, K. J. Lee, M. Cho, S. Kamala-Kannan, and B. T. Oh, "Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, no. 2, pp. 113–118, 2012.
  - [113] P. C. Chen, X. J. Huang, F. Huang, Y. Ou, M. R. Chen, and Z. K. Xu, "Immobilization of lipase onto cellulose ultrafine fiber membrane for oil hydrolysis in high performance bioreactor," *Cellulose*, vol. 18, pp. 1563–1571, 2011.
  - [114] Y. Dai, L. Yin, and J. Niu, "Laccase-Carrying Electrospun Fibrous Membranes for Adsorption and Degradation of PAHs in Shoal Soils," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 24, pp. 10611–10618, 2011.
  - [115] D. N. Tran, D.-J. Yang, and K. J. B. Jr., "Fabrication of cellulase protein fibers through concentric electrospinning," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 1–5, 2011.
  - [116] S. M. Lee, L. H. Jin, J. H. Kim, S. O. Han, H. Bin Na, T. Hyeon, Y. M. Koo, J. Kim, and J. H. Lee, "β-Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 33, no. 1, pp. 141–147, 2010.
  - [117] A. Moradzadegan, S.-O. Ranaei-Siadat, A. Ebrahim-Habibi, M. Barshan-Tashnizi, R. Jalili, S.-F. Torabi, and K. Khajeh, "Immobilization of acetylcholinesterase in nanofibrous PVA/BSA membranes by electrospinning," *Eng. Life Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 57–64, 2010.
  - [118] P. Chen, Y.-J. Sun, Z.-C. Zhu, R.-X. Wang, X.-D. Shi, C. Lin, and Y.-T. Ye, "A controlled release system of superoxide dismutase by electrospun fiber and its antioxidant activity in vitro," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 609–14, 2010.
  - [119] P. Kocbek, J. A. N. Pelipenko, J. Kristl, R. Rošic, P. Kocbek, J. A. N. Pelipenko, J. Kristl, and S. Baumgartner, "Nanofibers and their biomedical use," *Acta Pharm.*, vol. 63, no. 3, pp. 295–304, 2013.
  - [120] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008.
  - [121] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. 2007.
  - [122] O. P. Ward, "3.49 - Proteases," in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Second Edi., M. Moo-Young, Ed. Burlington: Academic Press, 2011, pp. 571–582.
  - [123] I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M. B. A. Swarte, and J. Drenth, "Structure of papain refined at 1.65 ?? resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 179, no. 2, pp. 233–256, 1984.
  - [124] M. Novinec and B. Lenarcic, "Papain-like peptidases: Structure, function, and evolution," *Biomol. Concepts*, vol. 4, no. 3, pp. 287–308, 2013.
  - [125] I. B. Klein and J. F. Kirsch, "The activation of papain and the inhibition of the active enzyme by carbonyl reagents," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 21, pp. 5928–5935, 1969.
  - [126] A. K. Patel, R. R. Singhania, and A. Pandey, "Novel enzymatic processes applied to the food industry," *Current Opinion in Food Science*, vol. 7, pp. 64–72, 2016.

- [127] D. L. Purich, "Chapter 1 - An Introduction to Enzyme Science," *Enzym. Kinet. Catal. & Control*, pp. 1–51, 2010.
- [128] S. Solís, J. Paniagua, J. C. Martínez, and M. Asomoza, "Immobilization of papain on mesoporous silica: pH effect," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 37, no. 2, pp. 125–127, 2006.
- [129] A. Homaei, H. Barkheh, R. Sariri, and R. Stevanato, "Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous biocatalysts," *Amino Acids*, vol. 46, no. 7, pp. 1649–1657, 2014.
- [130] X. Y. Liu, H. Y. Zeng, M. C. Liao, B. Feng, and B. F. C. A. Gohi, "Interaction of mercury and copper on papain and their combined inhibitive determination," *Biochem. Eng. J.*, vol. 97, pp. 125–131, 2015.
- [131] R. Ahmad and M. Sardar, "Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix," *Biochem. Anal. Biochem.*, vol. 4, no. 2, 2015.
- [132] F. López-Gallego, J. M. Guisan, and L. Betancor, *Immobilization of Enzymes and Cells*, vol. 1051. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.
- [133] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, and R. Fernandez-Lafuente, "Glutaraldehyde in biocatalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 207890, p. 1583, 2014.
- [134] Y. Wang and Y. L. Hsieh, "Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 309, no. 1–2, pp. 73–81, 2008.
- [135] L. Wu, X. Yuan, and J. Sheng, "Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning," *J. Memb. Sci.*, vol. 250, no. 1–2, pp. 167–173, 2005.
- [136] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [137] L. Wollweber, "S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Editors-In-Chief), Methods in Enzymology Volume 121: Immunochemical Techniques, Part I, Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies (Editors: J. J. LANGONE, H. VAN VUNAKIS). XIX + 947 S., 131 Tab., 215 Abb. Orlando-San ," *J. Basic Microbiol.*, vol. 27, no. 7, p. 368, 1987.
- [138] L. Wu, X. Yuan, and J. Sheng, "Immobilization of cellulase in nanofibrous {PVA} membranes by electrospinning," *J. Memb. Sci.*, vol. 250, no. 1–2, pp. 167–173, 2005.
- [139] M. G. Sankalia, R. C. Mashru, J. M. Sankalia, and V. B. Sutariya, "Physicochemical characterization of papain entrapped in ionotropically cross-linked kappa-carrageenan gel beads for stability improvement using Doehlert shell design," *J. Pharm. Sci.*, vol. 95, no. 9, pp. 1994–2013, 2006.
- [140] G. Vedantham, H. G. Sparks, S. U. Sane, S. Tzannis, and T. M. Przybycien, "A holistic approach for protein secondary structure estimation from infrared spectra in H<sub>2</sub>O solutions," *Anal. Biochem.*, vol. 285, pp. 33–49, 2000.
- [141] a. h. Kuptsov and g. n. Zhizhin, *Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers*. 1998.
- [142] K. C. S. Figueiredo, T. L. M. Alves, and C. P. Borges, "Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 111, no. 6, pp. 3074–3080, 2009.
- [143] V. M. Gun'ko, P. Pissis, A. Spanoudaki, V. I. Zarko, Y. M. Nychiporuk, L. S. Andriyko, E. V. Goncharuk, R. Lebeda, J. Skubiszewska-Zieba, V. D. Osovskii, and Y. G. Ptushinskii, "Relaxation phenomena in poly(vinyl alcohol)/fumed silica affected by interfacial water," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 312, no. 2, pp. 201–213, 2007.
- [144] A. Ü. Metin and E. Alver, "Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 39, no. 7, pp. 1137–1149, 2016.
- [145] S. M. A. Wahab, B. Gunasekaran, N. A. Shaharuddin, W. L. W. Johari, M. I. E. Halmi, N. A. M. Said, M. Y. Shukor, and N. A. Masdor, "A novel method for the determination of mercury in herbal preparation using an inhibitive assay based on the protease papain," *J. Environmental Microbiol. Toxicol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–4, 2013.
- [146] J. Wang, X. Feng, C. W. N. Anderson, Y. Xing, and L. Shang, "Remediation of mercury contaminated sites - A review," *J. Hazard. Mater.*, vol. 221–222, pp. 1–18, 2012.
- [147] J. Mutter, J. Naumann, C. Sadaghiani, H. Walach, and G. Drasch, "Amalgam studies: disregarding basic principles of

- mercury toxicity,” *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 207, no. 4. pp. 391–397, 2004.
- [148] A. H. Stern, “A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment,” *Environmental Research*, vol. 98, no. 1. pp. 133–142, 2005.
- [149] H. T. Hogberg, A. Kinsner-Ovaskainen, S. Coecke, T. Hartung, and A. K. Bal-Price, “mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an in vitro approach,” *Toxicol. Sci.*, vol. 113, no. 1, pp. 95–115, 2009.
- [150] M. Israr and S. V. Sahi, “Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 44, no. 10, pp. 590–595, 2006.
- [151] G. Pearson, “Hard and Soft Acids and Bases,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 22, pp. 3533–3539, 1963.
- [152] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,” *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 1. pp. 76–83, 2009.
- [153] D. McShan, P. C. Ray, and H. Yu, “Molecular toxicity mechanism of nanosilver,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, no. 1, pp. 116–127, 2014.
- [154] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, and M. J. Yacaman, “The bactericidal effect of silver nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, 2005.
- [155] Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. Kunisaki, and T. Tsuchido, “Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 7, pp. 4278–4281, 2003.
- [156] S. Prabhu and E. K. Poulouse, “Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects,” *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 1, p. 32, 2012.
- [157] R. Say, B. Garipcan, and S. Emir, “Preparation of poly ( hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylamidohistidine ) beads and its design as a affinity adsorbent for Cu ( II ) removal from aqueous solutions,” *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.*, vol. 196, pp. 199–207, 2002.
- [158] F. R. N. Gurd and P. E. Wilcox, “Complex Formation between Metallic Cations and Proteins, Peptides, and Amino Acids,” *Adv. Protein Chem.*, vol. 11, no. C, pp. 311–427, 1956.
- [159] J. Q. Lu, F. Jin, T. Q. Sun, and X. W. Zhou, “Multi-spectroscopic study on interaction of bovine serum albumin with lomefloxacin-copper(II) complex,” *Int J Biol Macromol*, vol. 40, no. 4, pp. 299–304, 2007.
- [160] Y. Zhang and D. E. Wilcox, “Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin,” *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 7, no. 3, pp. 327–337, 2002.
- [161] a B. Abdel-Mageed and F. W. Oehme, “A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron: I. Zinc,” *Vet. Hum. Toxicol.*, vol. 32, no. 1, pp. 34–39, 1990.
- [162] L. M. Klevay, S. J. Reck, and D. F. Barcome, “Evidence of dietary copper and zinc deficiencies,” *Jama J. Am. Med. Assoc.*, vol. 241, no. 18, pp. 1916–1918, 1979.
- [163] G. J. Fosmire, “Zinc toxicity,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 51, no. 2, pp. 225–227, 1990.
- [164] H. Waldmann-Meyer, “Thermodynamic Proton-, Cadmium-, and Zinc-Binding Constants of Serum Albumin Determined by Zone Electrophoresis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 235, pp. 3337–3345, 1960.
- [165] R. Sharma, “Enzyme Inhibition : Mechanisms and Scope,” *Enzym. Inhib. Bioapplications*, pp. 3–36, 2012.
- [166] M. Kobayashi and S. Shimizu, “Cobalt proteins,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 261, no. 1, pp. 1–9, 1999.
- [167] R. A. Martinelli, G. R. Hanson, J. S. Thompson, B. Holmquist, J. R. Pilbrow, D. S. Auld, and B. L. Vallee, “Characterization of the Inhibitor Complexes of Cobalt Carboxypeptidase A by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy,” *Biochemistry*, vol. 28, no. 1987, pp. 2251–2258, 1989.
- [168] D. G. Barceloux, “Cobalt,” *Clin. Toxicol.*, vol. 37, no. 2, pp. 201–216, 1999.
- [169] R. K. Tewari, P. Kumar, P. N. Sharma, and S. S. Bisht, “Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt,” *Plant Sci.*, vol. 162, no. 3, pp. 381–388, 2002.
- [170] S. Thakur and S. N. Rao, *Activation and Detoxification Enzymes*, no. 1. 2014.

- [171] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. 2007.
- [172] S. Sanllorente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, and M. Julia Arcos-Martínez, "Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. Application to the determination of arsenic(III)," *Sensors*, vol. 10, no. 3, pp. 2119–2128, 2010.
- [173] M. WINDHOLZ, "The Merck Index Online," *Science (80-. )*, vol. 226, no. 4680, pp. 1250–1250, Dec. 1984.
- [174] Brian Y Feng, Anang Shelat, Thompson N Dorman, R Kip Guy, and Brian K Shoichet, "High-throughput assays for promiscuous inhibitors," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 1, no. 3, pp. 146–148, 2005.
- [175] S. L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, and B. K. Shoichet, "Article A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and," pp. 1712–1722, 2002.
- [176] B. Bolto, T. Tran, M. Hoang, and Z. Xie, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 34, no. 9, pp. 969–981, 2009.
- [177] M. M. Burrell, *Enzymes of Molecular Biology*, vol. 16. New Jersey: Humana Press, 1993.

### 3. Experimentación

#### 3.1 Materiales y Reactivos

Papaína (E.C. 3.4.22.2, 1.6 U/mg) de látex de papaya, cisteína  $\geq 97\%$  ( $M_w$  121.16 g/mol), N-alfa-Benzoil-L-Arginina-4-Nitroanilida  $\geq 98\%$  (BAPA) ( $M_w$  434.88 g/mol), glutaraldehído grado I 50% acuoso ( $M_w$  100.12 g/mol), Tris buffer, ácido acético reactivo ACS  $\geq 99.7\%$ , cloruro de mercurio (I) ( $Hg_2Cl_2$ ) reactivo ACS  $\geq 99.5\%$ , nitrato de plata ( $AgNO_3$ ) reactivo ACS  $\geq 99.0\%$ , nitrato de cobalto (II) ( $CoN_2O_6 \cdot 6H_2O$ ) reactivo ACS  $\geq 98\%$ , albúmina de suero bovino (BSA) polvo liofilizado  $\geq 96\%$  (electroforesis en gel de agarosa) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) ( $M_w$  372.25 g/mol), dimetil sulfóxido (DMSO) ( $M_w$  78.13), cloruro cúprico ( $CuCl_2$ ) reactivo ACS  $\geq 99.0\%$ , cloruro de zinc ( $ZnCl_2$ ) reactivo ACS  $\geq 97.0\%$  fueron provistos por Productos Químicos Monterrey. Poli (vinil alcohol) (PVA) con 98% de hidrólisis y un peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) de 126 kg/mol, poli (vinil alcohol) (PVA) con una hidrólisis de 87-89 % y un peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ) de 13-23 kg/mol fueron comprados en Aldrich. SDS (SIGMA), Triton-X-100 (SIGMA), Nonidet-P40 (SIGMA), Bradford dye-binding assay.

#### 3.2 Encapsulación de papaína

La encapsulación de la enzima papaína fue llevada a cabo siguiendo el procedimiento reportado por nuestro grupo de trabajo [83]. Cada una de las corridas se dividió en cuatro partes de igual peso. Dos de las muestras se utilizaron para las pruebas de actividad enzimática y las otras dos se utilizaron para calcular la cantidad de proteína encapsulada en las nanofibras electrohiladas. Las muestras se almacenaron en un refrigerador a 6 ° C de temperatura.

##### 3.2.1 Inmovilización de papaína

La inmovilización de papaína encapsulada en las fibras de PVA se logró mediante su entrecruzamiento mediante glutaraldehído. Este tipo de aldehído es agente entrecruzante comúnmente utilizado para la inmovilización de proteínas en matrices poliméricas, debido a su alta reactividad hacia los grupos aminos y carboxílico[131][132][133][134][135]. Las fibras se expusieron al vapor de glutaraldehído introduciéndose en un reactor dentro de un horno 50 °C por espacio de 1 hora, después se dejaron en la campana por 10 minutos

para remover el glutaraldehído extra para su posterior uso en las pruebas de actividad enzimática. La figura 10 muestra un esquema completo llevado del proceso de inmovilización.

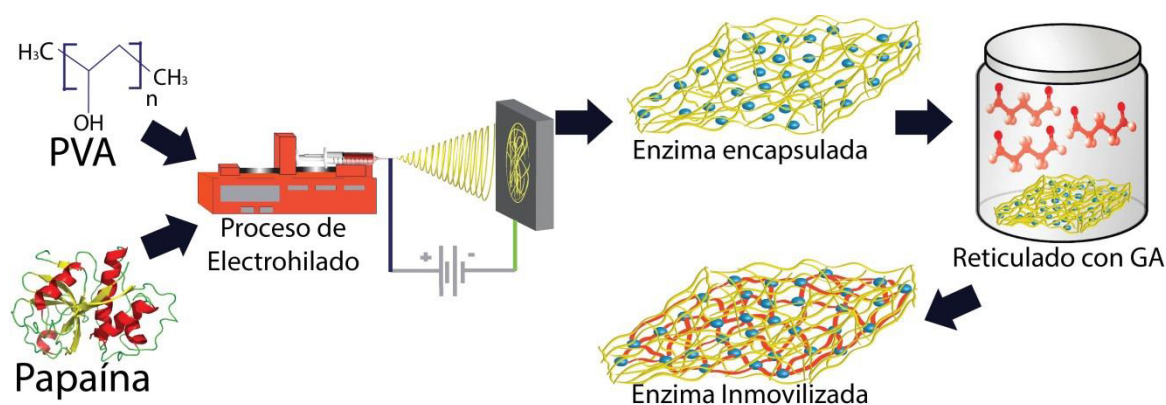


Fig. 10 Proceso de Inmovilización de la enzima papaína

### 3.3 Determinación de la cantidad de enzima encapsulada

La cantidad total de enzima encapsulada en las nanofibras recién electrohiladas se calculó empleando el ensayo Bio-Rad. Para este propósito se preparó una curva de calibración a partir de soluciones a diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) (2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml) en tubos de 2 ml. También se preparó un blanco con agua destilada. Se tomaron las dos partes de cada corrida de electrohilado destinadas a este propósito y se sumergieron por 24 horas en una solución buffer Tris de pH 7.5, con el objetivo de que toda la cantidad presente de proteína en las nanofibras se difundiera hacia el buffer. Para realizar las mediciones se tomó un volumen de 0.2 ml del buffer y se añadieron 1 ml del reactivo Bio-Rad. Se mezcló bien y se dejó reaccionar por 5 minutos para posteriormente leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm [136]. Este mismo procedimiento se aplicó para cada una de las soluciones estándar y también para una solución de papaína de 0.1 mg/ml. Una vez determinadas las absorbancias de las muestras, se utilizó la curva de calibración para convertir los datos a unidades de masa. Finalmente se realizó una conversión de unidades para expresar los resultados en miligramos. Para calcular el porcentaje de eficiencia de carga enzimática se dividió la cantidad calculada de la proteína entre el peso total de las nanofibras y se multiplicó por 100.



### 3.4 Medición de la actividad enzimática y estudios de inhibición e interferencia

La medición de la actividad de la papaína se midió con la enzima libre e inmovilizada, después en presencia de iones metálicos, posteriormente en presencia de iones metálicos e interferentes como se muestra en el esquema de la figura 11.

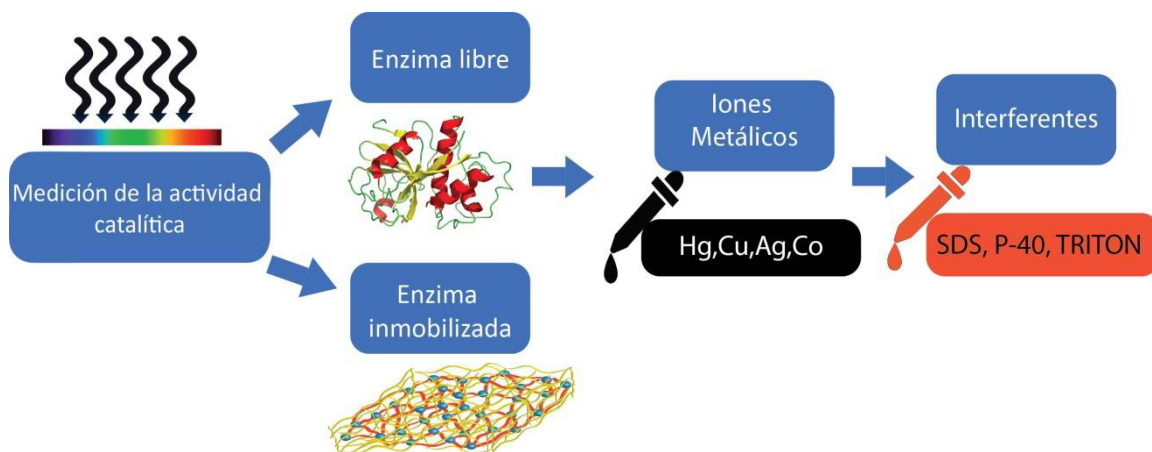


Fig. 11 Proceso de la medición de la actividad enzimática

#### 3.4.1 Preparación del sustrato activador

Para la preparación del sustrato activador se disolvieron 43.5 mg de BAPA en 1 ml de DMSO, mientras que 60.58 mg de cisteína se disolvían en 99 ml de Tris-HCl buffer pH 7.5. Una vez disuelto adecuadamente se mezclaron las dos soluciones, para obtener 100 ml de la solución del sustrato activadora de la enzima. Esta solución de sustrato se preparaba fresca diariamente. A diferencia del sustrato activador estándar reportado en la literatura, en este trabajo el reactivo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) no se agregó al medio de reacción debido a que es un quelante de metales y podría afectar el proceso de inhibición de la actividad enzimática de la papaína debido a la presencia de iones metálicos.

#### 3.4.2 Preparación de iones metálicos

Tanto la papaína en solución como inmovilizada en nanofibras de PVA fueron sometidas a pruebas para medir la sensibilidad de su actividad enzimática a la presencia de iones metálicos. Se prepararon soluciones stock disolviendo sales metálicas en agua desionizada hasta llegar a concentraciones de 2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30ppm y 40 ppm de cada metal. Las sales metálicas usadas fueron  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$  y  $\text{CoN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

### **3.4.3 Preparación de xenobióticos**

Tanto la papaína en solución como inmovilizada en nanofibras de PVA fueron sometidas a pruebas para medir la sensibilidad de su actividad enzimática a la presencia de iones metálicos e interferentes al mismo tiempo. Con estas pruebas se busca determinar qué tan específico es el cambio de la actividad enzimática de la papaína inmovilizada ante la presencia de iones metálicos en solución. Los interferentes utilizados fueron SDS, Triton-X-100, Nonidet-P40, ya que han sido reportados con una interferencia positiva[76]. De cada interferente se prepararon soluciones stock. Los cuales se prepararon al 2% (v/v) en agua desionizada, posteriormente se agregaron a la reacción final a una concentración de 0.25% (v/v).

### **3.4.4 Medición de la actividad de la enzima**

Se evaluó la actividad amidasa de la papaína empleando como sustrato al N-alfa-Benzoil-L-Arginina-4-Nitroanilida (BAPA). El experimento se llevó a cabo con la papaína libre e inmovilizada, el ensayo está basado en el método de Earlander et al. adaptado para papaína [137]. Se colocaron en tubos de ensayo 1 ml de una solución de papaína con una concentración de 1 mg/ml o una muestra de la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA. A estas muestras se les agregó 5 ml de la solución de sustrato activadora de la enzima y se dejaron reaccionar por espacio de 25 minutos a temperatura ambiente. Después se detuvo la reacción con la adición de 1 ml de ácido acético al 30%. Posteriormente se leyó el cambio en la absorbancia a 410 nm correspondiente a la presencia de p-nitroanilina liberada como resultado de la acción amidasa de la papaína sobre el sustrato BAPA. Esta absorbancia era tomada por espacio de 15 segundos. Un mililitro de agua destilada fue usado como blanco (figura 12)

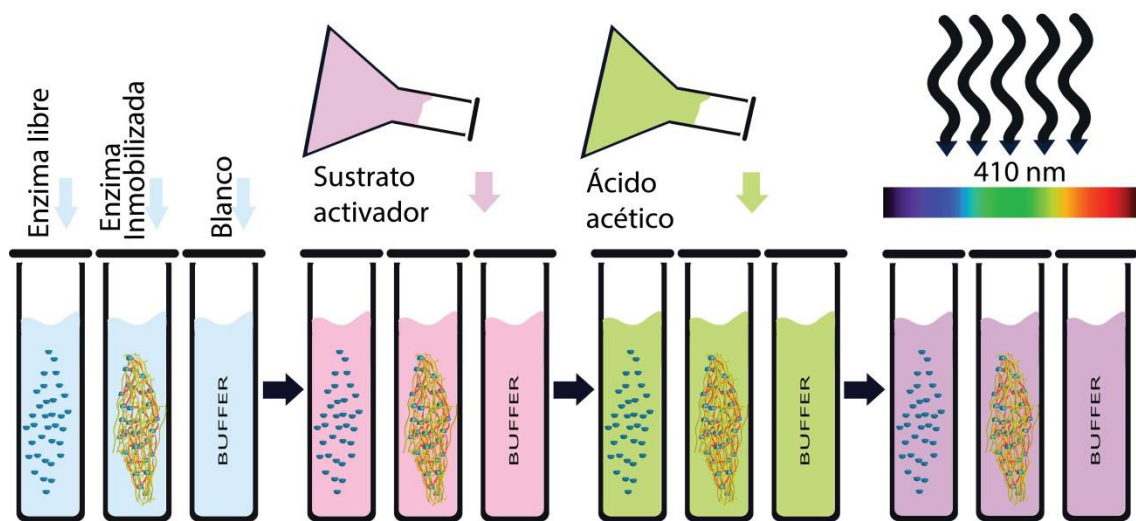


Fig. 12 Esquema del proceso de la medición actividad enzimática

Este mismo procedimiento se llevó acabo para la medición de la actividad de la enzima en presencia de iones metálicos añadiendo al tubo de ensayo 0.5 ml de iones de metales pesados de diferentes concentraciones (2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30ppm y 40 ppm) de cada metal (figura 13).

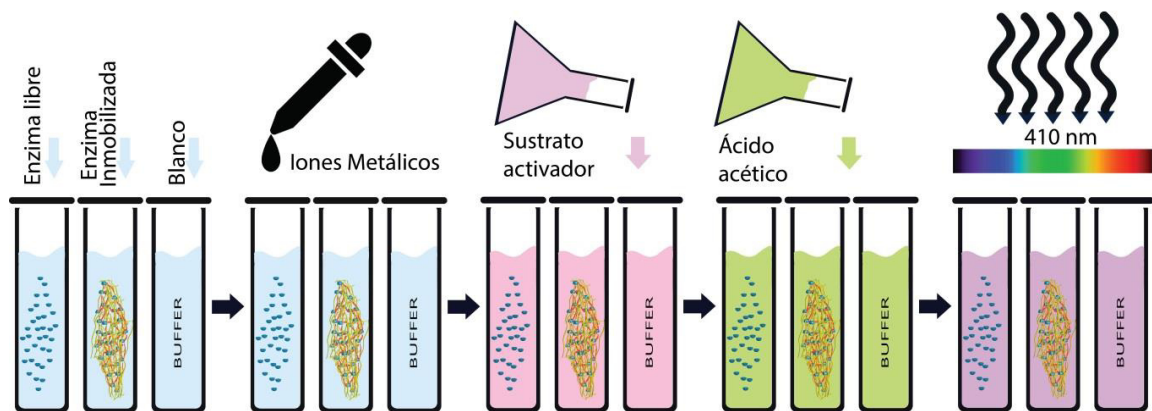


Fig. 13 Esquema del proceso de la medición actividad enzimática en presencia de iones metálicos

Se repitió el procedimiento para la medición de la actividad de la enzima en presencia de iones y xenobióticos, solo que esta vez se añadió al tubo de ensayo 0.5 ml de iones de metales pesados de diferentes concentraciones (2.5 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30ppm y 40 ppm) de cada metal, y posteriormente se agregaron al mismo tubo de ensayo .014 ml de la solución de cada interferente (SDS, Triton-X-100, Nonidet-P40) (figura 14).

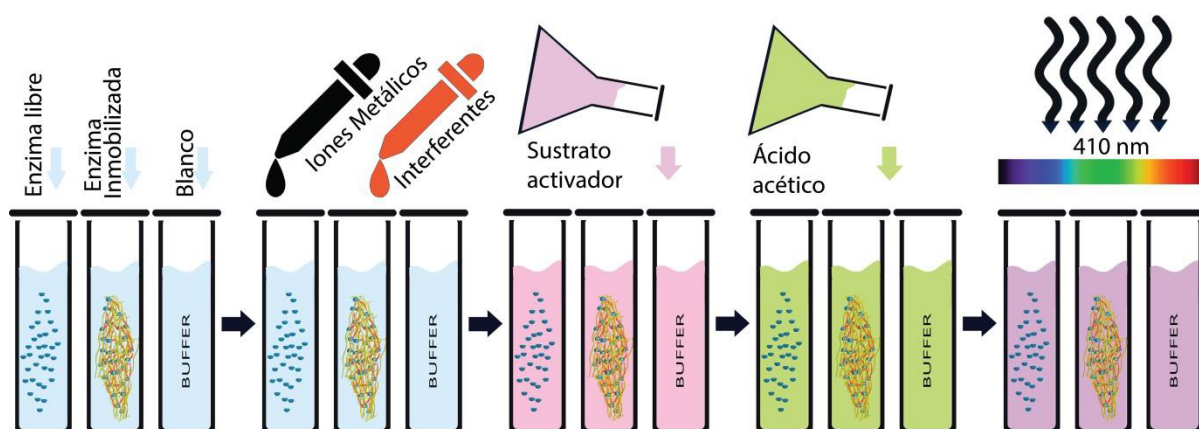


Fig. 14 Esquema del proceso de la medición actividad enzimática en presencia de iones metálicos e interferentes

En todos los casos la actividad enzimática obtenida se expresa en unidades BAPA, las cuales se calculan mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades BAPA} = \Delta_{410\text{nm}}/\text{min} \times 1000 \times 2.5/8800$$

donde 8,800 es el coeficiente de extinción molar del sustrato BAPA, 2.5 es el volumen en ml,  $\Delta_{410\text{nm}}/\text{min}$  es la absorbancia a 410nm por minutos de reacción y 1000 es un factor de conversión que resulta de convertir moles a micromoles y ml a l. La actividad específica se obtuvo al dividir las unidades BAPA entre la cantidad de la enzima papaína presente en las nanofibras de PVA y es expresada en unidades BAPA por miligramo de proteína.

### 3.5 Equipos Utilizados

La morfología y distribución del diámetro de las nanofibras fue caracterizada mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo FEI Nova Nano Sem Model 200. La presencia de la enzima dentro de las nanofibras de PVA se confirmó por espectroscopia infrarroja (FTIR). Para el análisis térmico de las nanofibras se utilizó el calorímetro diferencial de barrido (DSC) modelo TA Instruments Q1000. Para realizar estas pruebas se electrohilieron nanofibras a diferentes porcentaje de contenido enzimático 8%,10%,11%,13%, posteriormente se pesaron 5 mg de cada muestra y se realizaron las pruebas calorimétricas.

Para la evaluación de la actividad de la enzima y cálculo de la cantidad de proteína inmovilizada en las fibras se utilizó un espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV/Vis) modelo Perkin Elmer Lambda UV 35.

Para la síntesis de fibras se utilizó un equipo de electrohilado el cual consiste en una fuente de alto voltaje de corriente directa marca *Gamma*, un colector de aluminio el cual se conecta al cátodo de la fuente de voltaje y el ánodo es conectado a una aguja de la jeringa marca BD Plasstipak 3ml (22G x 32mm). El flujo de la solución polimérica de PVA se llevó a cabo mediante una bomba de inyección marca *New Era Pump Systems*.

## Referencias

- [1] A. Br.,utigam, "The freshwater crisis: Basic elements," in *World Conservation*, vol. 30, no. 2, 1999, pp. 45–113.
- [2] *World Health Statistics 2015*. 2015.
- [3] CONAGUA, "Estadísticas del Agua en México," *Uso Del Agua*, vol. Capitulo 3, p. 14, 2011.
- [4] M. D. DeLong, *Rivers of North America*. 2005.
- [5] I. S. Cohen, Ú. O. Spring, and G. D. Padilla, "Water Resources in Mexico," *Water Resour. Mex. Scarcity, Degrad. Stress. Conflicts, Manag. Policy*, vol. 7, pp. 39–49, 2011.
- [6] C. M. Lewandowski, N. Co-investigator, and C. M. Lewandowski, *Water Resources in Mexico*, vol. 7. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [7] W. Schwartz, "G. EVELYN HUTCHINSON, A Treatise on Limnology, Vol. I, Part: 1 Geography and Physics of Lakes. XIV, 540 S., 154 Abb., 63 Tab., 11 Tafeln. Vol. I, Part 2: Chemistry of Lakes. XIV, 474 S., 74 Abb., 69 Tab. (Verbesserter Neudruck der Ausgabe von 1957). New Y," *Z. Allg. Mikrobiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 256–257, 1977.
- [8] R. Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, "Heavy metals and living systems: An overview," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 43(3), p. 246–253., 2011.
- [9] S. S. Ahmad, M. R. Azim, M. Bilal, Q. Mahmood, and A. Rashid, "Current Status of Toxic Metals Addition to Environment and Its Consequences," in *The Plant Family Brassicaceae*, vol. 21, 2012, pp. 35–69.

- [10] H. Ali, E. Khan, and M. A. Sajad, "Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications," *Chemosphere*, vol. 91, no. 7, pp. 869–881, 2013.
- [11] J. O. Nriagu, "The rise and fall of leaded gasoline," *Sci. Total Environ.*, vol. 92, pp. 13–28, 1990.
- [12] R. a. Wuana and F. E. Okieimen, "Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation," *ISRN Ecol.*, vol. 2011, pp. 1–20, 2011.
- [13] N. C. Brady and R. R. Weil, *The nature and properties of soils*, vol. 13, no. Ed. 11. 2002.
- [14] G. Bánfalvi, *Heavy metals, trace elements and their cellular effects*. 2011.
- [15] J. W. More and R. S., *Heavy Metal in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment*. 1984.
- [16] Ministerio de Medio Ambiente de Japón, "Enseñanzas de la Enfermedad de Minamata y el Manejo del Mercurio en Japón," *Div. la Salud y Segur. Medioambient. Dep. Salud Ambient. Minist. del Medio Ambient. Japón*, 2012.
- [17] P. L. Smedley, "Chapter 7 Arsenic in groundwater – south and east Asia," pp. 180–209, 2003.
- [18] U. K. Chowdhury, B. K. Biswas, T. R. Chowdhury, G. Samanta, B. K. Mandal, G. C. Basu, C. R. Chanda, D. Lodh, K. C. Saha, S. K. Mukherjee, S. Roy, S. Kabir, Q. Quamruzzaman, and D. Chakraborti, "Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India," *Environ. Health Perspect.*, vol. 108, no. 5, pp. 393–397, 2000.
- [19] S. S. Afzal Hossain, M. Fazle Rabbi, Abdur Rahman Abid, "Arsenic Problem in Groundwater, a Growing Threat to Public Health in Bangladesh: An Overall Perspective and Management Modelling Approach," in *Groundwater Updates*, 2000, pp. 473–474.
- [20] L. Rodríguez-Lado, G. Sun, M. Berg, Q. Zhang, H. Xue, Q. Zheng, and C. A. Johnson, "Groundwater Arsenic Contamination Throughout China," *Science (80- )*, vol. 341, no. 6148, pp. 866–868, 2013.
- [21] † Michael Berg \*, ‡ Hong Con Tran, ‡ Thi Chuyen Nguyen, ‡ Hung Viet Pham, † Roland Schertenleib, and and Walter Giger†, "Arsenic Contamination of Groundwater and Drinking Water in Vietnam: A Human Health Threat," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, no. 13, pp. 2621–2626, 2001.
- [22] C.-H. Tseng, "An overview on peripheral vascular disease in blackfoot disease-hyperendemic

villages in Taiwan.," *Angiology*, vol. 53, no. 5, pp. 529–537, 2002.

- [23] W. P. Tseng, "Effects and dose--response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic," *Env. Heal. Perspect.*, vol. 19, pp. 109–119, 1977.
- [24] C. J. Chen, Y. C. Chuang, T. M. Lin, and H. Y. Wu, "Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: High-arsenic artesian well water and cancers," *Cancer Res.*, vol. 45, no. 11 II, pp. 5895–5899, 1985.
- [25] C. Puthiyasekar, M. a Neelakantan, and S. Poongothai, "Heavy metal contamination in bore water due to industrial pollution and polluted and non polluted sea water intrusion in Thoothukudi and Tirunelveli of South Tamil Nadu, India.," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 85, no. 6, pp. 598–601, 2010.
- [26] A. Waseem, J. Arshad, F. Iqbal, A. Sajjad, Z. Mehmood, and G. Murtaza, "Pollution Status of Pakistan: A Retrospective Review on Heavy Metal Contamination of Water, Soil, and Vegetables," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–29, 2014.
- [27] J. E. Bunnell, R. B. Finkelman, J. A. Centeno, and O. Selinus, "Medical Geology: A globally emerging discipline," *Geologica Acta*, vol. 5, no. 3. pp. 273–281, 2007.
- [28] J. Bundschuh, A. P. Carrera, and M. Litter, "Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana," ... *Iberoam. Cienc. y ...*, 2008.
- [29] D. L. López, J. Bundschuh, P. Birkle, M. A. Armienta, L. Cumbal, O. Sracek, L. Cornejo, and M. Ormachea, "Volcanic arsenic and boron pollution of Ilopango lake," in *Geogenic Arsenic in Groundwater of Latin America*, 2008, pp. 129–143.
- [30] D. L. López, J. Bundschuh, P. Birkle, M. A. Armienta, L. Cumbal, O. Sracek, L. Cornejo, and M. Ormachea, "Arsenic in volcanic geothermal fluids of Latin America.," *Sci. Total Environ.*, vol. 429, pp. 57–75, 2012.
- [31] B. R. Figueiredo, M. I. Litter, C. R. Silva, N. Mañay, S. C. Londono, A. M. Rojas, C. Garzón, T. Tosiani, G. M. Di Giulio, E. M. De Capitani, Â. J. Dos Anjos, R. S. Angélica, M. C. Morita, M. M. B. Paoliello, F. G. Cunha, A. M. Sakuma, and O. A. Licht, "Medical Geology Studies in South America," in *Medical Geology*, 2010.
- [32] M. C. Silva-Forsberg, B. R. Forsberg, and V. K. Zeidemann, "Mercury Contamination in Humans Linked to River Chemistry in the Amazon Basin," *Ambio*, vol. 28. pp. 519–521, 1999.

- [33] O. Malm, "Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon.," *Environ. Res.*, vol. 77, no. 2, pp. 73–8, 1998.
- [34] A. C. Barbosa, S. R. L. Silva, and J. G. Dórea, "Concentration of mercury in hair of indigenous mothers and infants from the Amazon basin," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 34, no. 1, pp. 100–105, 1998.
- [35] A. C. Barbosa, A. M. Garcia, and J. R. De Souza, "Mercury contamination in hair of riverine populations of Apiacas reserve in the Brazilian Amazon," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 97, no. 1–2, pp. 1–8, 1997.
- [36] J. E. M. Beurskens, G. A. J. Mol, H. L. Barreveld, B. van Munster, and H. J. Winkels, "Geochronology of priority pollutants in a sedimentation area of the rhine river," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 12, no. 9, pp. 1549–1566, 1993.
- [37] H. J. Winkels, J. P. M. Vink, J. E. M. Beurskens, and S. B. Kroonenberg, "Distribution and geochronology of priority pollutants in a large sedimentation area, River Rhine, The Netherlands," *Appl. Geochemistry*, vol. 8, no. 2, pp. 95–101, 1993.
- [38] T. Hamers, J. H. Kamstra, J. van Gils, M. C. Kotte, and A. G. van Hattum, "The influence of extreme river discharge conditions on the quality of suspended particulate matter in Rivers Meuse and Rhine (The Netherlands)," *Environ. Res.*, vol. 143, pp. 241–255, 2015.
- [39] F. Paez-Osuna, H. Bojorquez-Leyva, M. Berges-Tiznado, O. A. Rubio-Hernandez, J. F. Fierro-Sanudo, J. Ramirez-Rochin, and J. A. Leon-Canedo, "Heavy metals in waters and suspended sediments affected by a mine tailing spill in the upper San Lorenzo River, Northwestern Mexico.," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 94, no. 5, pp. 583–588, 2015.
- [40] E. D. González-González, L. M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, P. Vieyra-Reyes, H. Islas-Flores, S. García-Medina, J. M. Jiménez-Vargas, C. Razo-Estrada, and R. Pérez-Pastén, "Metals and Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals Drugs Present in Water from Madín Reservoir (Mexico) Induce Oxidative Stress in Gill, Blood, and Muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*)," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 67, no. 2, pp. 281–295, 2014.
- [41] Ó. Raúl, M. -Villa, M. Ortega-Escobar, C. Ramírez-Ayala, E. Uscanga-Mortera, R. Ramos-Bello, Y. Amada, and L. Reyes-Ortigoza, "METALES PESADOS TOTALES Y ARSÉNICO EN EL AGUA PARA RIEGO DE PUEBLA Y VERACRUZ, MÉXICO," *Rev. Int. Contam. Ambie*, vol. 28, no. 1, pp. 39–48, 2012.



- [42] I. Rubio-Franchini, M. López-Hernández, M. G. Ramos-Espinosa, and R. Rico-Martínez, "Bioaccumulation of Metals Arsenic, Cadmium, and Lead in Zooplankton and Fishes from the Tula River Watershed, Mexico," *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 227, no. 1, p. 5, 2016.
- [43] A. G. Romero-Calderón, B. Morales-Vela, R. Rosiles-Martínez, L. D. Olivera-Gómez, and A. Delgado-Estrella, "Metals in Bone Tissue of Antillean Manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, pp. 9–14, 2015.
- [44] C. Jane Wyatt, "Incidence of Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern Mexico," *Environ. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 114–119, 1998.
- [45] L. Rosales-Hoz and a. Carranza-Edwards, "Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos River, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 60, pp. 553–561, 1998.
- [46] S. F. Villanueva and A. V Botello, "Metal pollution in coastal areas of Mexico.," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 157, pp. 53–94, 1998.
- [47] R. Iturbe, R. M. Flores, and L. G. Torres, "Soil and water contamination levels in an out-of-service oil distribution and storage station in Michoacan, Mexico," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 146, pp. 261–281, 2003.
- [48] I. Razo, L. Carrizales, J. Castro, F. Díaz-Barriga, and M. Monroy, "Arsenic and Heavy Metal Pollution of Soil, Water and Sediments in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico," *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 152, no. 1–4, pp. 129–152, 2003.
- [49] J. R. Parga, D. L. Cocke, J. L. Valenzuela, J. a. Gomes, M. Kesmez, G. Irwin, H. Moreno, and M. Weir, "Arsenic removal via electrocoagulation from heavy metal contaminated groundwater in la Comarca Lagunera Mexico," *J. Hazard. Mater.*, vol. 124, no. 1–3, pp. 247–254, 2005.
- [50] J. García-Hernández, L. García-Rico, M. E. Jara-Marini, R. Barraza-Guardado, and A. Hudson Weaver, "Concentrations of heavy metals in sediment and organisms during a harmful algal bloom (HAB) at Kun Kaak Bay, Sonora, Mexico.," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 50, no. 7, pp. 733–9, 2005.
- [51] S. C. Gardner, S. L. Fitzgerald, B. A. Vargas, and L. M. Rodriguez, "Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California Peninsula, Mexico," *Biometals*, vol. 19, no. 1, pp. 91–99, 2006.
- [52] C. González-Macías, I. Schifter, D. B. Lluch-Cota, L. Méndez-Rodríguez, and S. Hernández-Vázquez, "Distribution, enrichment and accumulation of heavy metals in coastal sediments of Salina Cruz Bay, México," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 118, pp. 211–230, 2006.

- [53] N. Cantú-Medellín, N. O. Olguín-Monroy, L. C. Méndez-Rodríguez, and T. Zenteno-Savín, "Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico.," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 56, no. 1, pp. 60–6, 2009.
- [54] L. Cadena-Cárdenas, L. Méndez-Rodríguez, T. Zenteno-Savín, J. García-Hernández, and B. Acosta-Vargas, "Heavy metal levels in Marine Mollusks from areas with, or without, mining activities along the Gulf of California, Mexico," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 57, no. 1, pp. 96–102, 2009.
- [55] A. Gómez-Alvarez, D. Meza-Figueroa, A. I. Villalba-Atondo, J. L. Valenzuela-García, J. Ramírez-Hernández, and J. Almendariz-Tapia, "Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005), Mexico-US border," *Environ. Geol.*, vol. 57, pp. 1469–1479, 2009.
- [56] M. De La Luz Vázquez-Sauceda, G. Aguirre-Guzmán, J. G. Sánchez-Martínez, and R. Pérez-Castañeda, "Cadmium, lead and zinc concentrations in water, sediment and oyster (*Crassostrea virginica*) of San Andres Lagoon, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 86, no. 4, pp. 410–414, 2011.
- [57] M. R. Mayorquín, "“Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de una hidroeléctrica (P.H. Las Cruces) en Nayarit, México,”" p. 168, 2011.
- [58] M. De La Luz Vázquez-Sauceda, R. Pérez-Castañeda, J. G. Sánchez-Martínez, and G. Aguirre-Guzmán, "Cadmium and lead levels along the estuarine ecosystem of Tigre River-San Andres Lagoon, Tamaulipas, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 89, no. 4, pp. 782–785, 2012.
- [59] C. P. Ley-Quirón, A. A. Zavala-Norzagaray, J. G. Réndon-Maldonado, T. L. Espinosa-Carreón, A. Canizales-Román, D. C. Escobedo-Urías, M. L. Leal-Acosta, C. E. Hart, and A. A. Aguirre, "Selected Heavy Metals and Selenium in the Blood of Black Sea Turtle (*Chelonia mydas agassizii*) from Sonora, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 91, no. 6, pp. 645–651, 2013.
- [60] P. Spanopoulos-Zarco, J. Ruelas-Inzunza, M. Meza-Montenegro, K. Osuna-Sánchez, and F. Amezcua-Martínez, "Health risk assessment from mercury levels in bycatch fish species from the coasts of Guerrero, Mexico (Eastern Pacific)," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 93, no. 3, pp. 334–8, 2014.
- [61] A. A. Zavala-Norzagaray, C. P. Ley-Quirón, T. L. Espinosa-Carreón, A. Canizales-Román, C. E. Hart, and A. A. Aguirre, "Trace Elements in Blood of Sea Turtles *Lepidochelys olivacea* in the Gulf

- of California, Mexico,” *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 93, no. 5, pp. 536–541, 2014.
- [62] S. Guédron, C. Duwig, B. L. Prado, D. Point, M. G. Flores, and C. Siebe, “(Methyl)Mercury, Arsenic, and Lead Contamination of the World’s Largest Wastewater Irrigation System: the Mezquital Valley (Hidalgo State—Mexico),” *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 225, no. 8, p. 2045, 2014.
- [63] F. Arduini and G. Palleschi, *4 - Screening and confirmatory methods for the detection of heavy metals in foods*. Woodhead Publishing Limited, 2013.
- [64] NMX-AA-051-SCFI-2001, “Análisis De Agua - Determinación De Metales Por Absorción Atómica En Aguas Naturales , Potables , Residuales Y Residuales Tratadas - Método De Prueba ( Cancela a La Nmx-Aa-051-1981 ) Water Analysis - Determination of Metals By Atomic Absorption in Natural,” pp. 1–47, 2001.
- [65] G. Plascencia, “Espectrometría de masas,” pp. 1–40, 2003.
- [66] D. Martínez B., a. J. Barón González, and O. D. Gil Novoa, “Espectrometría de fluorescencia de rayos X,” *Rev. la Soc. Colomb. Física*, vol. 38, no. 2, pp. 790–793, 2006.
- [67] G. Aragay and A. Merkoc, “Recent Trends in Macro- , Micro- , and Nanomaterial-Based Tools and Strategies for Heavy-Metal Detection,” pp. 3433–3458, 2011.
- [68] A. Mimendia, A. Legin, A. Merko??i, and M. del Valle, “Use of Sequential Injection Analysis to construct a potentiometric electronic tongue: Application to the multidetermination of heavy metals,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 146, no. 2, pp. 420–426, 2010.
- [69] N. Verma and M. Singh, “Biosensors for heavy metals,” *BioMetals*, vol. 18, no. 2, pp. 121–129, 2005.
- [70] Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, and T. Machinami, “Mercury II -Mediated Formation of Thymine - Hg II - Thymine Base Pairs in DNA Duplexes,” pp. 2172–2173, 2006.
- [71] E. Diesel, M. Schreiber, and J. R. Van Der Meer, “Development of bacteria-based bioassays for arsenic detection in natural waters,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, no. 3, pp. 687–693, 2009.
- [72] I. Bontidean, C. Berggren, G. Johansson, E. Csöregi, B. Mattiasson, J. R. Lloyd, K. J. Jakeman, and N. L. Brown, “Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors,” *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 19, pp. 4162–4169, 1998.
- [73] P. Chen, B. Greenberg, S. Taghavi, C. Romano, D. Van Der Lelie, and C. He, “An exceptionally

selective lead(II)-regulatory protein from *Ralstonia metallidurans*: Development of a fluorescent lead(II) probe," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 18, pp. 2715–2719, 2005.

- [74] M. Y. Shukor, N. A. Bakar, A. R. Othman, I. Yunus, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "Development of an inhibitive enzyme assay for copper," *J. Environ. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 39–44, 2009.
- [75] X. Zhu, L. Xu, Y. Lou, H. Yu, X. Li, D. A. Blake, and F. Liu, "Preparation of specific monoclonal antibodies (MAbs) against heavy metals: MAbs that recognize chelated cadmium ions," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 19, pp. 7648–7653, 2007.
- [76] Y. Shukor, N. A. Baharom, F. A. Rahman, M. P. Abdullah, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "Development of a heavy metals enzymatic-based assay using papain," *Anal. Chim. Acta*, vol. 566, no. 2, pp. 283–289, 2006.
- [77] M. Lorenzo, D. Moldes, S. Rodríguez Couto, and M. A. Sanromán, "Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds," *Chemosphere*, vol. 60, no. 8, pp. 1124–1128, 2005.
- [78] O. Prakash, M. Talat, S. H. Hasan, and R. K. Pandey, "Enzymatic detection of heavy metal ions in aqueous solution from vegetable wastes by immobilizing pumpkin (*Cucumis melo*) urease in calcium alginate beads," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 13, no. 2, pp. 210–216, 2008.
- [79] N. Wahab, SMA and Gunasekaran, B and Shaharuddin, NA and Johari, WLW and Halmi, MIE and Said, NAM and Shukor, MY Abd and Masdor, "A novel method for the determination of mercury in herbal preparation using an inhibitive assay based on the protease papain," *J. Env. Microbiol Toxicol*, vol. 1(1), pp. 1–4, 2013.
- [80] M. Y. Shukor, N. Masdor, N. A. Baharom, J. A. Jamal, M. P. A. Abdullah, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 144, no. 3, pp. 283–291, 2008.
- [81] M. Y. Shukor, N. A. Baharom, N. A. Masdor, M. P. A. Abdullah, N. A. Shamaan, J. A. Jamal, and M. A. Syed, "The development of an inhibitive determination method for zinc using a serine protease," *J. Environ. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 17–22, 2009.
- [82] G. Baskaran, N. A. Masdor, M. A. Syed, and M. Y. Shukor, "An inhibitive enzyme assay to detect mercury and zinc using protease from *coriandrum sativum*," *Sci. World J.*, vol. 2013, 2013.
- [83] I. E. Moreno-Cortez, J. Romero-García, V. González-González, D. I. García-Gutierrez, M. A. Garza-Navarro, and R. Cruz-Silva, "Encapsulation and immobilization of papain in electrospun

- nanofibrous membranes of {PVA} cross-linked with glutaraldehyde vapor," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 52, pp. 306–314, 2015.
- [84] B. Brena, P. Gonzalez-Pombo, and F. Batista-Viera, "Immobilization of enzymes: A literature survey," *Immobil. Enzym. Cells Third Ed.*, vol. 1051, pp. 15–31, 2013.
  - [85] M. V. Vol'kenshtein, *Enzyme Physics*, vol. 1. Boston, MA: Springer US, 1969.
  - [86] E. Fischer, "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme," *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 27, pp. 2985–2993, 1894.
  - [87] D. E. Koshland, "The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 33, no. 2324, pp. 2375–2378, 1995.
  - [88] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, and G. Bohlmann, "Industrial use of immobilized enzymes," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6437–6474, 2013.
  - [89] I. Benucci, M. Esti, and K. Liburdi, "Effect of free and immobilised stem bromelain on protein haze in white wine," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 20, no. 3, pp. 347–352, 2014.
  - [90] A. Kaur and J. N. Chakraborty, "Controlled eco-friendly shrink-resist finishing of wool using bromelain," *J. Clean. Prod.*, Aug. 2015.
  - [91] H. R. Maurer, "Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 9, pp. 1234–1245, 2001.
  - [92] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2013.
  - [93] R. Sharma, *Enzyme Inhibition and Bioapplications*. InTech, 2012.
  - [94] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, and G. Palleschi, "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 8, pp. 1405–1423, 2006.
  - [95] C. Spahn and S. D. Minter, "Enzyme Immobilization in Biotechnology," *Recent Patents Eng.*, vol. 2, no. 3, pp. 195–200, 2008.
  - [96] J. Kim, J. W. Grate, and P. Wang, "Nanostructures for enzyme stabilization," *Chemical Engineering Science*, vol. 61, no. 3, pp. 1017–1026, 2006.
  - [97] I. Chibata, T. Tosa, T. Mori, T. Watanabe, and N. Sakata, "Immobilized tannin - a novel adsorbent

- for protein and metal ion,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 8, no. 3. pp. 130–136, 1986.
- [98] T. Xie, A. Wang, L. Huang, H. Li, Z. Chen, Q. Wang, and X. Yin, “Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization,” *African J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 19, pp. 4724–4733, 2009.
- [99] I. Kim, S. Choi, S. Kim, and J. Jang, *Smart Sensors for Health and Environment Monitoring*. 2015.
- [100] E. L. Rexeisen, W. Fan, T. O. Pangburn, R. R. Taribagil, F. S. Bates, T. P. Lodge, M. Tsapatsis, and E. Kokkoli, “Self-Assembly of Fibronectin Mimetic Peptide-Amphiphile Nanofibers,” *Langmuir*, vol. 26, no. 3, pp. 1953–1959, 2010.
- [101] † Guicun Li\* and Zhikun Zhang, “Synthesis of Dendritic Polyaniline Nanofibers in a Surfactant Gel,” *Macromolecules*, vol. 37, no. 8, pp. 2683–2685, 2004.
- [102] X. Liu and P. X. Ma, “Gelatin Scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4094–4103, 2010.
- [103] X. B. Xing, Y. Q. Wang, and B. J. Li, “Nanofiber drawing and nanodevice assembly in poly(trimethylene terephthalate),” *Opt. Express*, vol. 16, no. 14, pp. 10815–10822, 2008.
- [104] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, “Electrospinning of nanofibers,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, 2005.
- [105] D. H. Reneker and I. Chun, “Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning,” *Nanotechnology*, vol. 7, no. 3, pp. 216–223, 1999.
- [106] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [107] S. Saallah, M. N. Naim, I. W. Lenggoro, M. N. Mokhtar, N. F. A. Bakar, and M. Gen, “Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning,” *Biotechnol. Reports*, vol. 10, pp. 44–48, 2016.
- [108] M. Maryšková, I. Ardao, C. A. García-González, L. Martinová, J. Rotková, and A. Ševců, “Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 89, pp. 31–38, 2016.
- [109] T. R. Silva, D. P. Rodrigues, J. M. S. Rocha, M. H. Gil, S. C. S. Pinto, J. A. Lopes-da-Silva, and A. J. Guimaraes, “Immobilization of trypsin onto poly(ethylene terephthalate)/poly(lactic acid) nonwoven nanofiber mats,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 104, pp. 48–56, 2015.

- [110] J. Li, Z. Zhao, T. Mo, L. Wang, and P. Li, "Immobilization of aminoacylase on electrospun nanofibrous membrane for the resolution of dl-theanine," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 116, pp. 24–28, 2015.
- [111] S. Ghosh, S. R. Chaganti, and R. S. Prakasham, "Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme l-asparaginase," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 74, no. 1–2, pp. 132–137, 2012.
- [112] P. Sathishkumar, J. C. Chae, A. R. Unnithan, T. Palvannan, H. Y. Kim, K. J. Lee, M. Cho, S. Kamalakannan, and B. T. Oh, "Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, no. 2, pp. 113–118, 2012.
- [113] P. C. Chen, X. J. Huang, F. Huang, Y. Ou, M. R. Chen, and Z. K. Xu, "Immobilization of lipase onto cellulose ultrafine fiber membrane for oil hydrolysis in high performance bioreactor," *Cellulose*, vol. 18, pp. 1563–1571, 2011.
- [114] Y. Dai, L. Yin, and J. Niu, "Laccase-Carrying Electrospun Fibrous Membranes for Adsorption and Degradation of PAHs in Shoal Soils," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 24, pp. 10611–10618, 2011.
- [115] D. N. Tran, D.-J. Yang, and K. J. B. Jr., "Fabrication of cellulase protein fibers through concentric electrospinning," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 1–5, 2011.
- [116] S. M. Lee, L. H. Jin, J. H. Kim, S. O. Han, H. Bin Na, T. Hyeon, Y. M. Koo, J. Kim, and J. H. Lee, "β-Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 33, no. 1, pp. 141–147, 2010.
- [117] A. Moradzadegan, S.-O. Ranaei-Siadat, A. Ebrahim-Habibi, M. Barshan-Tashnizi, R. Jalili, S.-F. Torabi, and K. Khajeh, "Immobilization of acetylcholinesterase in nanofibrous PVA/BSA membranes by electrospinning," *Eng. Life Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 57–64, 2010.
- [118] P. Chen, Y.-J. Sun, Z.-C. Zhu, R.-X. Wang, X.-D. Shi, C. Lin, and Y.-T. Ye, "A controlled release system of superoxide dismutase by electrospun fiber and its antioxidant activity in vitro.," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 609–14, 2010.
- [119] P. Kocbek, J. A. N. Pelipenko, J. Kristl, R. Rošic, P. Kocbek, J. A. N. Pelipenko, J. Kristl, and S. Baumgartner, "Nanofibers and their biomedical use.," *Acta Pharm.*, vol. 63, no. 3, pp. 295–304, 2013.

- [120] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 13. pp. 1989–2006, 2008.
- [121] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. 2007.
- [122] O. P. Ward, "3.49 - Proteases," in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Second Edi., M. Moo-Young, Ed. Burlington: Academic Press, 2011, pp. 571–582.
- [123] I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M. B. A. Swarte, and J. Drenth, "Structure of papain refined at 1.65 ?? resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 179, no. 2, pp. 233–256, 1984.
- [124] M. Novinec and B. Lenarcic, "Papain-like peptidases: Structure, function, and evolution," *Biomol. Concepts*, vol. 4, no. 3, pp. 287–308, 2013.
- [125] I. B. Klein and J. F. Kirsch, "The activation of papain and the inhibition of the active enzyme by carbonyl reagents," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 21, pp. 5928–5935, 1969.
- [126] A. K. Patel, R. R. Singhanian, and A. Pandey, "Novel enzymatic processes applied to the food industry," *Current Opinion in Food Science*, vol. 7. pp. 64–72, 2016.
- [127] D. L. Purich, "Chapter 1 - An Introduction to Enzyme Science," *Enzym. Kinet. Catal. & Control*, pp. 1–51, 2010.
- [128] S. Solís, J. Paniagua, J. C. Martínez, and M. Asomoza, "Immobilization of papain on mesoporous silica: pH effect," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 37, no. 2, pp. 125–127, 2006.
- [129] A. Homaei, H. Barkheh, R. Sariri, and R. Stevanato, "Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous biocatalysts," *Amino Acids*, vol. 46, no. 7, pp. 1649–1657, 2014.
- [130] X. Y. Liu, H. Y. Zeng, M. C. Liao, B. Feng, and B. F. C. A. Gohi, "Interaction of mercury and copper on papain and their combined inhibitive determination," *Biochem. Eng. J.*, vol. 97, pp. 125–131, 2015.
- [131] R. Ahmad and M. Sardar, "Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix," *Biochem. Anal. Biochem.*, vol. 4, no. 2, 2015.
- [132] F. López-Gallego, J. M. Guisan, and L. Betancor, *Immobilization of Enzymes and Cells*, vol. 1051. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.
- [133] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, and R. Fernandez-Lafuente, "Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme



- immobilization," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 207890, p. 1583, 2014.
- [134] Y. Wang and Y. L. Hsieh, "Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 309, no. 1–2, pp. 73–81, 2008.
- [135] L. Wu, X. Yuan, and J. Sheng, "Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning," *J. Memb. Sci.*, vol. 250, no. 1–2, pp. 167–173, 2005.
- [136] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [137] L. Wollweber, "S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Editors-In-Chief), *Methods in Enzymology Volume 121: Immunochemical Techniques, Part I, Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies* (Editors: J. J. LANGONE, H. VAN VUNAKIS). XIX + 947 S., 131 Tab., 215 Abb. Orlando-San ," *J. Basic Microbiol.*, vol. 27, no. 7, p. 368, 1987.
- [138] L. Wu, X. Yuan, and J. Sheng, "Immobilization of cellulase in nanofibrous {PVA} membranes by electrospinning," *J. Memb. Sci.*, vol. 250, no. 1–2, pp. 167–173, 2005.
- [139] M. G. Sankalia, R. C. Mashru, J. M. Sankalia, and V. B. Sutariya, "Physicochemical characterization of papain entrapped in ionotropically cross-linked kappa-carrageenan gel beads for stability improvement using Doehlert shell design," *J. Pharm. Sci.*, vol. 95, no. 9, pp. 1994–2013, 2006.
- [140] G. Vedantham, H. G. Sparks, S. U. Sane, S. Tzannis, and T. M. Przybycien, "A holistic approach for protein secondary structure estimation from infrared spectra in H<sub>2</sub>O solutions.," *Anal. Biochem.*, vol. 285, pp. 33–49, 2000.
- [141] a. h. Kuptsov and g. n. Zhizhin, *Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers*. 1998.
- [142] K. C. S. Figueiredo, T. L. M. Alves, and C. P. Borges, "Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 111, no. 6, pp. 3074–3080, 2009.
- [143] V. M. Gun'ko, P. Pissis, A. Spanoudaki, V. I. Zarko, Y. M. Nychiporuk, L. S. Andriyko, E. V. Goncharuk, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zieba, V. D. Osovskii, and Y. G. Ptushinskii, "Relaxation phenomena in poly(vinyl alcohol)/fumed silica affected by interfacial water," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 312, no. 2, pp. 201–213, 2007.
- [144] A. Ü. Metin and E. Alver, "Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol.

39, no. 7, pp. 1137–1149, 2016.

- [145] S. M. A. Wahab, B. Gunasekaran, N. A. Shaharuddin, W. L. W. Johari, M. I. E. Halmi, N. A. M. Said, M. Y. Shukor, and N. A. Masdor, “A novel method for the determination of mercury in herbal preparation using an inhibitive assay based on the protease papain,” *J. Enviromental Microbiol. Toxicol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–4, 2013.
- [146] J. Wang, X. Feng, C. W. N. Anderson, Y. Xing, and L. Shang, “Remediation of mercury contaminated sites - A review,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 221–222, pp. 1–18, 2012.
- [147] J. Mutter, J. Naumann, C. Sadaghiani, H. Walach, and G. Drasch, “Amalgam studies: disregarding basic principles of mercury toxicity.,” *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 207, no. 4. pp. 391–397, 2004.
- [148] A. H. Stern, “A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment,” *Environmental Research*, vol. 98, no. 1. pp. 133–142, 2005.
- [149] H. T. Hogberg, A. Kinsner-Ovaskainen, S. Coecke, T. Hartung, and A. K. Bal-Price, “mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an in vitro approach,” *Toxicol. Sci.*, vol. 113, no. 1, pp. 95–115, 2009.
- [150] M. Israr and S. V. Sahi, “Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*,” *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 44, no. 10, pp. 590–595, 2006.
- [151] G. Pearson, “Hard and Soft Acids and Bases,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 22, pp. 3533–3539, 1963.
- [152] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,” *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 1. pp. 76–83, 2009.
- [153] D. McShan, P. C. Ray, and H. Yu, “Molecular toxicity mechanism of nanosilver,” *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, no. 1, pp. 116–127, 2014.
- [154] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, and M. J. Yacaman, “The bactericidal effect of silver nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, 2005.
- [155] Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. Kunisaki, and T. Tsuchido, “Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate mode of bactericidal action of silver zeolite

- and its comparison with that of silver nitrate," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 7, pp. 4278–4281, 2003.
- [156] S. Prabhu and E. K. Poulose, "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects," *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 1, p. 32, 2012.
- [157] R. Say, B. Garipcan, and S. Emir, "Preparation of poly ( hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylamidohistidine ) beads and its design as a affinity adsorbent for Cu ( II ) removal from aqueous solutions," *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.*, vol. 196, pp. 199–207, 2002.
- [158] F. R. N. Gurd and P. E. Wilcox, "Complex Formation between Metallic Cations and Proteins, Peptides, and Amino Acids," *Adv. Protein Chem.*, vol. 11, no. C, pp. 311–427, 1956.
- [159] J. Q. Lu, F. Jin, T. Q. Sun, and X. W. Zhou, "Multi-spectroscopic study on interaction of bovine serum albumin with lomefloxacin-copper(II) complex," *Int J Biol Macromol*, vol. 40, no. 4, pp. 299–304, 2007.
- [160] Y. Zhang and D. E. Wilcox, "Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 7, no. 3, pp. 327–337, 2002.
- [161] a B. Abdel-Mageed and F. W. Oehme, "A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron: I. Zinc," *Vet. Hum. Toxicol.*, vol. 32, no. 1, pp. 34–39, 1990.
- [162] L. M. Klevay, S. J. Reck, and D. F. Barcome, "Evidence of dietary copper and zinc deficiencies.," *Jama J. Am. Med. Assoc.*, vol. 241, no. 18, pp. 1916–1918, 1979.
- [163] G. J. Fosmire, "Zinc toxicity," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 51, no. 2, pp. 225–227, 1990.
- [164] H. Waldmann-Meyer, "Thermodynamic Proton-, Cadmium-, and Zinc-Binding Constants of Serum Albumin Determined by Zone Electrophoresis," *J. Biol. Chem.*, vol. 235, pp. 3337–3345, 1960.
- [165] R. Sharma, "Enzyme Inhibition : Mechanisms and Scope," *Enzym. Inhib. Bioapplications*, pp. 3–36, 2012.
- [166] M. Kobayashi and S. Shimizu, "Cobalt proteins," *Eur. J. Biochem.*, vol. 261, no. 1, pp. 1–9, 1999.
- [167] R. A. Martinelli, G. R. Hanson, J. S. Thompson, B. Holmquist, J. R. Pilbrow, D. S. Auld, and B. L. Vallee, "Characterization of the Inhibitor Complexes of Cobalt Carboxypeptidase A by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy," *Biochemistry*, vol. 28, no. 1987, pp. 2251–2258, 1989.
- [168] D. G. Barceloux, "Cobalt," *Clin. Toxicol.*, vol. 37, no. 2, pp. 201–216, 1999.

- [169] R. K. Tewari, P. Kumar, P. N. Sharma, and S. S. Bisht, "Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt," *Plant Sci.*, vol. 162, no. 3, pp. 381–388, 2002.
- [170] S. Thakur and S. N. Rao, *Activation and Detoxification Enzymes*, no. 1. 2014.
- [171] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. 2007.
- [172] S. Sanllorente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, and M. Julia Arcos-Martínez, "Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. Application to the determination of arsenic(III)," *Sensors*, vol. 10, no. 3, pp. 2119–2128, 2010.
- [173] M. WINDHOLZ, "The Merck Index Online," *Science (80-. )*, vol. 226, no. 4680, pp. 1250–1250, Dec. 1984.
- [174] Brian Y Feng, Anang Shelat, Thompson N Dorman, R Kip Guy, and Brian K Shoichet, "High-throughput assays for promiscuous inhibitors," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 1, no. 3, pp. 146–148, 2005.
- [175] S. L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, and B. K. Shoichet, "Article A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and," pp. 1712–1722, 2002.
- [176] B. Bolto, T. Tran, M. Hoang, and Z. Xie, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 34, no. 9. pp. 969–981, 2009.
- [177] M. M. Burrell, *Enzymes of Molecular Biology*, vol. 16. New Jersey: Humana Press, 1993.

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1. Morfología de las nanofibras electrohiladas

La morfología de las nanofibras electrohiladas se puede apreciar en la figura 15, dichas fibras mostraron una morfología libre de defectos y un diámetro promedio de  $89.67 \pm 1.46$  nm (figura 15 (a, c)). En la micrografía de las nanofibras con contenido enzimático (figura 15b) se puede observar un incremento en el diámetro hasta alcanzar un valor promedio de  $233.21 \pm 1.13$  nm (figura 15d). Este incremento de diámetro se ha reportado para sistemas de inmovilización de enzimas en nanofibras poliméricas debido principalmente al aumento en el peso molecular de la solución polimérica como consecuencia de la adición de la enzima[134][135][117].

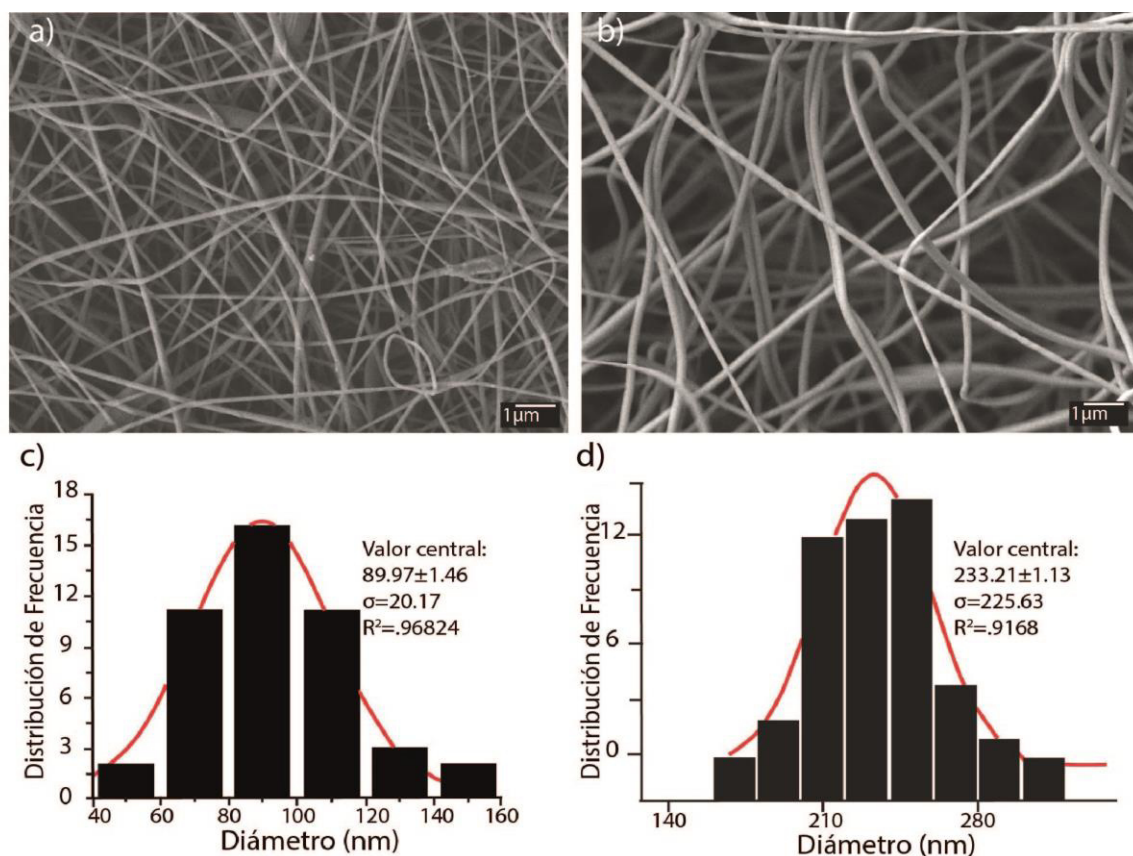


Fig. 15 Imágenes de SEM a) nanofibras de PVA, b) nanofibras de PVA-enzima papaína, distribución de diámetros de las morfologías c) distribución de diámetros de nanofibras de PVA, d) distribución de diámetros de nanofibras de PVA-enzima Papaína.

En la figura 16a se muestran las fibras después de someterse al proceso de entrecruzamiento mediante su exposición a vapor de glutaraldehído (GA); en este caso se puede observar que las fibras tuvieron un incremento en su diámetro hasta alcanzar los  $235.61 \pm 1.52$  nm (figura 16c). Este incremento en el diámetro central de las nanofibras electrohiladas ha sido atribuido a una absorción de las moléculas de GA en la estructura de las nanofibras poliméricas [83].

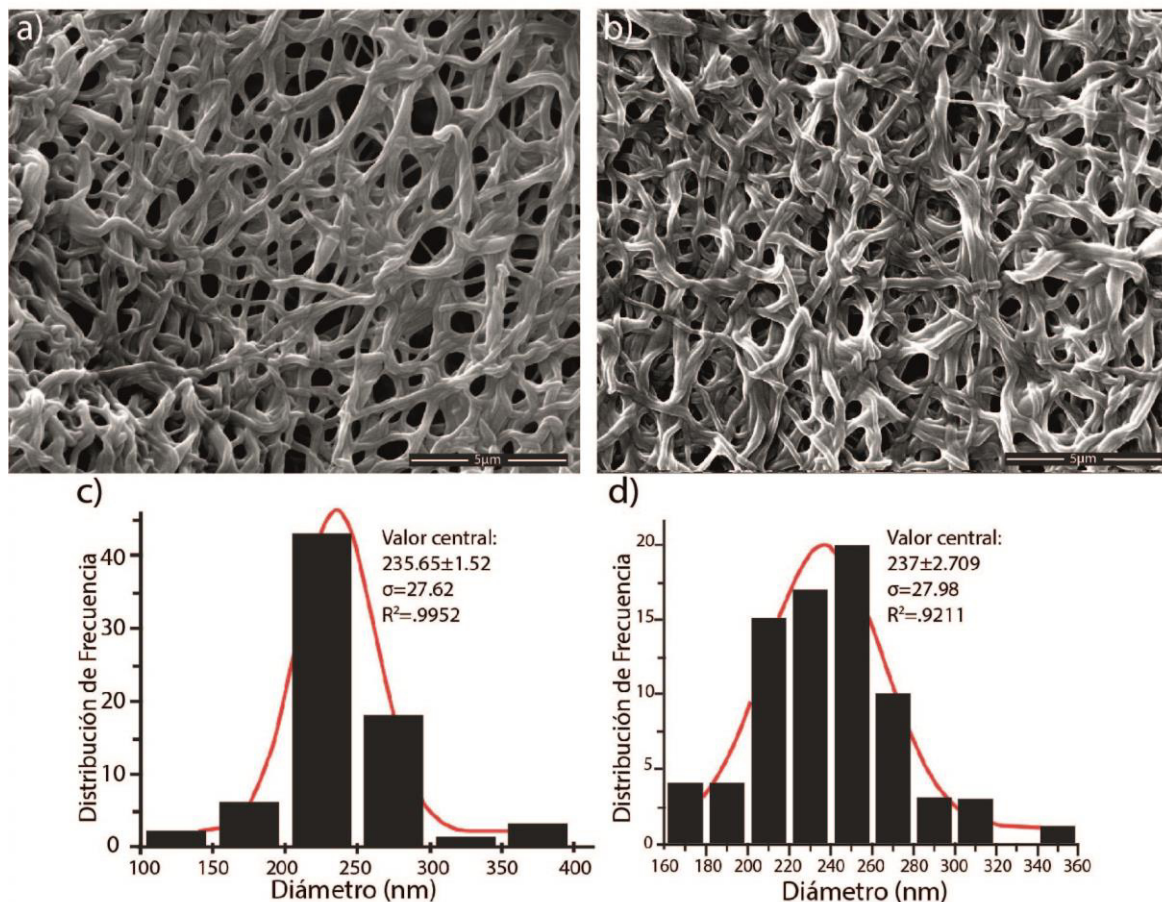


Fig. 16 Imágenes de SEM a) nanofibras PVA-enzima papaína después del proceso de entrecruzamiento, b) nanofibras de PVA-enzima papaína después de la sumersión en buffer. c) distribución de diámetros de nanofibras PVA-enzima Papaína después del proceso de reticulado, d) distribución de diámetros de nanofibras de PVA-enzima papaína después del uso del buffer.

En la figura 16b se observa la morfología de las nanofibras entrecruzadas después de su inmersión en buffer durante la medición de la actividad enzimática. En este caso la distribución de diámetro arrojó un valor central de  $237 \pm 2.709$  nm (figura 16d). Es importante mencionar que a pesar del cambio de diámetro debido tanto al contacto con GTA como a la inmersión en buffer, las nanofibras con la enzima

inmovilizada mantuvieron su estructura fibrosa en ambos casos, permitiendo de esta manera el aprovechamiento de las características de las nanofibras vinculadas a su gran relación área-volumen.

## **4.2 Presencia de la enzima papaína en las nanofibras de PVA**

### **4.2.1 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)**

La presencia de la enzima papaína en las nanofibras electrohiladas PVA fue evidenciada mediante un análisis de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). En el espectro de infrarrojo de las nanofibras de PVA sin carga enzimática se puede apreciar la banda de absorción característica del grupo funcional O-H alrededor de  $3315\text{ cm}^{-1}$ , así como dos bandas de absorción en  $2940\text{ cm}^{-1}$  y  $2898\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del grupo metilo respectivamente, así como la banda en  $1090\text{ cm}^{-1}$  debida al estiramiento del grupo funcional C-O (figura 17a) [138]. En las muestras con la enzima papaína encapsulada en las nanofibras de PVA (figura 17b) se presentó una banda de absorción en  $1650\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del enlace C=O en la región amida I y una banda de absorción a  $1545\text{ cm}^{-1}$  inducida por el curvamiento del enlace N-H y el estiramiento del enlace C-N en la región amida II, lo cual sugiere la presencia de la enzima en las fibras de PVA [139][140].

De igual manera, en el espectro de infrarrojo de las muestras conteniendo la papaína encapsulada (figura 17b) se muestra un ensanchamiento de la banda de absorción en  $3315\text{ cm}^{-1}$  en comparación con el espectro de la muestra sin enzima, lo cual es asignado a una superposición de las bandas de absorción correspondientes al estiramiento de los enlaces O-H y N-H [141]. En la figura 17c la efectividad de la reacción de entrecruzamiento de las muestras electrohiladas de PVA fue confirmada por la banda característica de absorción a  $1720\text{ cm}^{-1}$  de los grupos de aldehídos libres y la de  $1097\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los grupos acetilo. En el mismo espectro también podemos afirmar que se llevó a cabo el proceso de entrecruzamiento debido a la presencia de una bien formada banda de absorción

en  $1150\text{ cm}^{-1}$ , la cual es indicativa de la formación de enlaces  $\text{-C-O-C-}$ , generados por las reacciones entre los grupos  $\text{-OH}$  de las cadenas moleculares de PVA y los enlaces  $\text{-C-}$  de la molécula de GA [142].

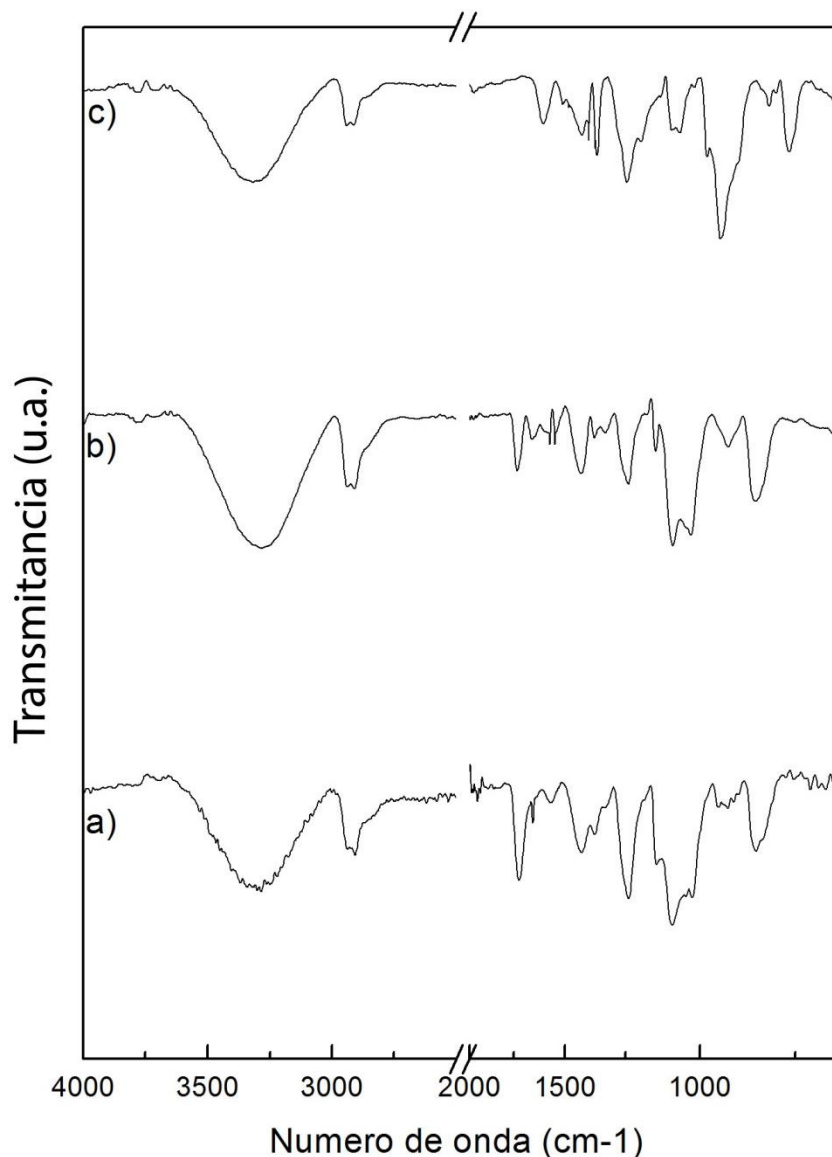


Fig. 17 Espectros de infrarrojo (a) nanofibras de PVA sin carga enzimática, (b) muestra de papaína encapsulada en nanofibras de PVA, (c) muestra de papaína inmovilizada en nanofibras de PVA mediante entrecruzamiento con GA

#### 4.3 Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En las pruebas realizadas mediante DSC se utilizaron nanofibras sin entrecruzar con diferentes porcentajes de enzima encapsulada (8%,10%,11%,13%), esto con el fin de conocer más sobre la interacción de las moléculas enzimáticas con la matriz



de nanofibras electrohiladas de PVA. En la figura 18 podemos observar la disminución de la  $T_g$  con respecto al aumento de porcentaje de enzima encapsulada, lo cual implica un aumento en la movilidad de las cadenas poliméricas del PVA como resultado del impedimento estérico provocado por las moléculas de proteína embebidas en la matriz de nanofibras.

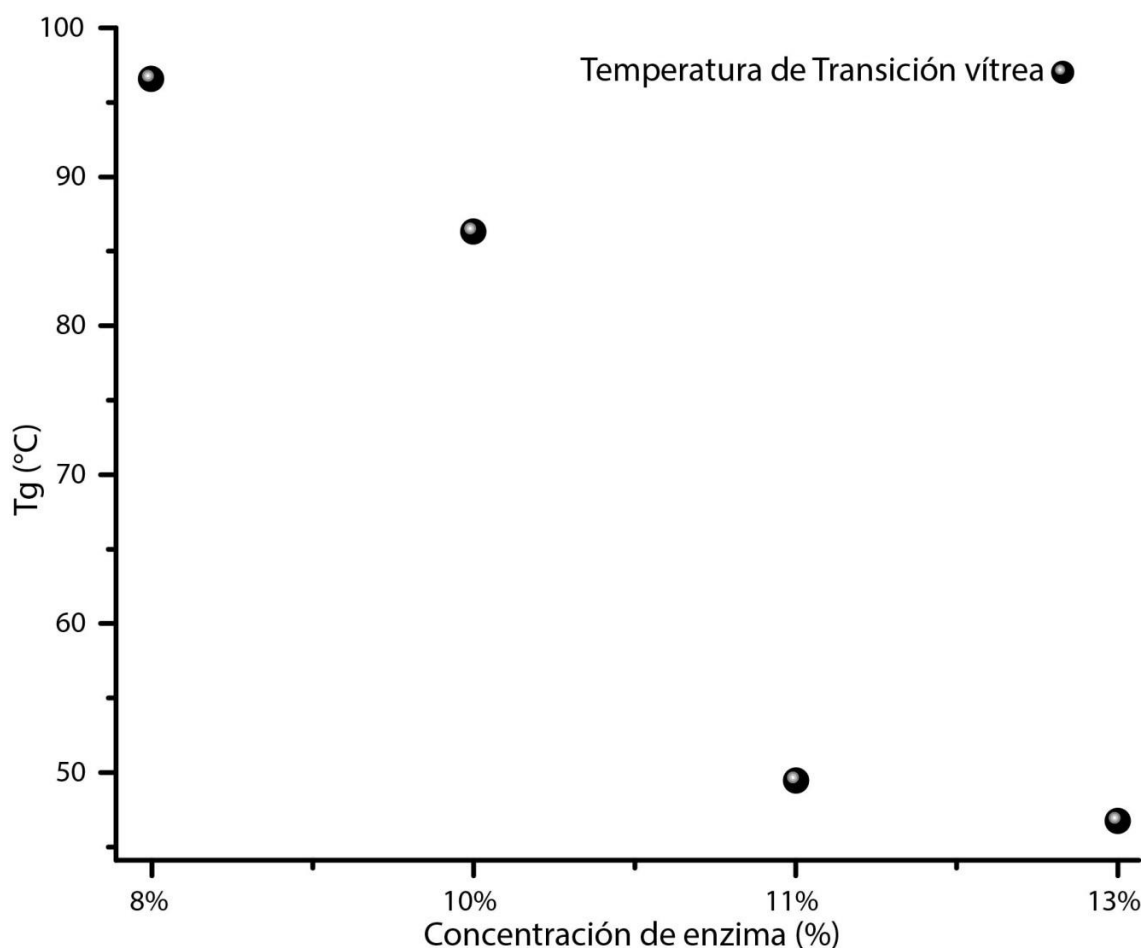


Fig. 18 Comportamiento de la  $T_g$  con respecto a la concentración enzimática en la matriz de nanofibras de PVA

Por otro lado en la figura 19 , se puede apreciar que la entalpia de fusión va en decremento conforme se aumentó la concentración de enzima, esto significa que las interacciones de las moléculas enzimáticas con la matriz polimérica provocan una disminución en la habilidad de las cadenas poliméricas para acomodarse en forma de regiones ordenadas cristalinas que puedan participar en el proceso de fusión, tal y como se ha reportado en la literatura[143].

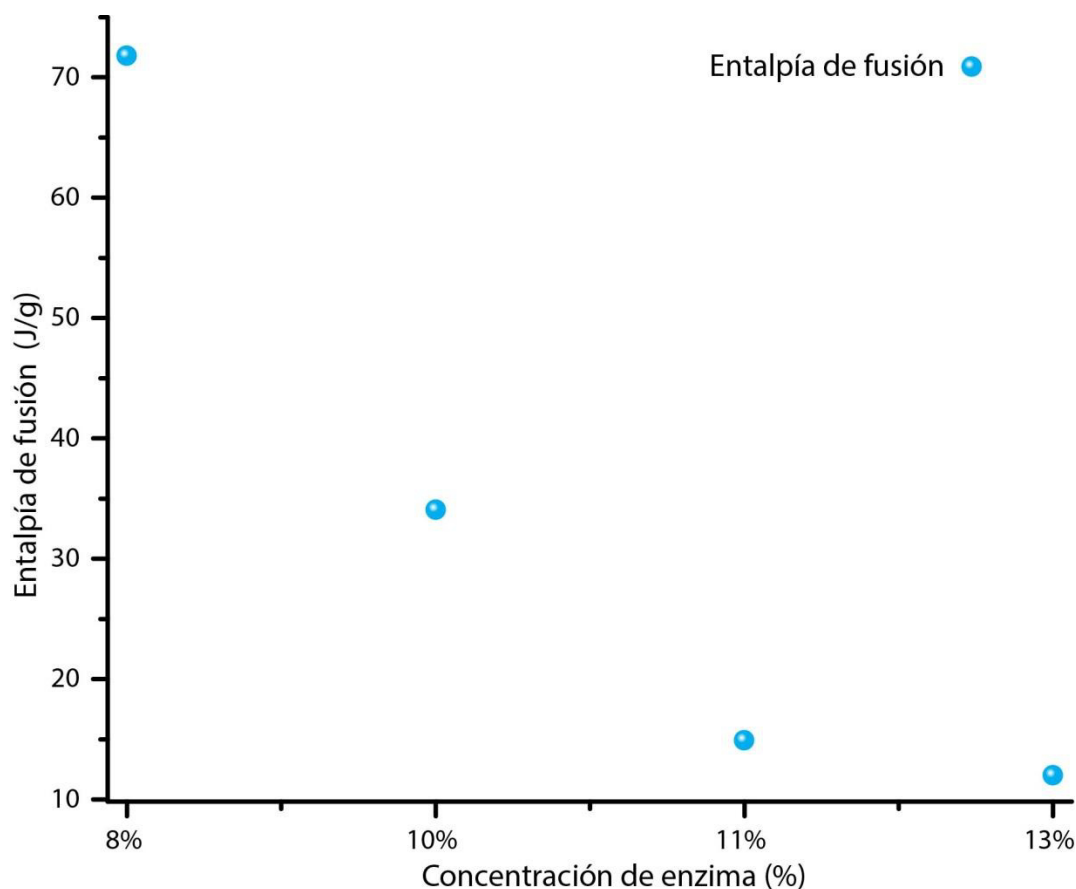


Fig. 19 Comportamiento de la entalpía de fusión con respecto a la concentración enzimática

Igualmente, en la gráfica de la figura 20 se observa una disminución progresiva del punto de fusión, una vez que se incrementa la concentración enzimática en las nanofibras poliméricas, dicha variación confirma una disminución en la cristalinidad aunado a una reducción en el tamaño de cristal en la matriz polimérica como consecuencia del aumento en el número de moléculas de enzima papaína en la matriz de nanofibras de PVA. De lo anterior podemos deducir que la matriz nanofibrosa de PVA está formada por un dominio cristalino, en el cual hay poca presencia de moléculas enzimáticas y un dominio amorfo donde las enzimas de papaína interactúan con las moléculas de PVA vía fuertes interacciones intermoleculares tipo puente de hidrógeno [134].

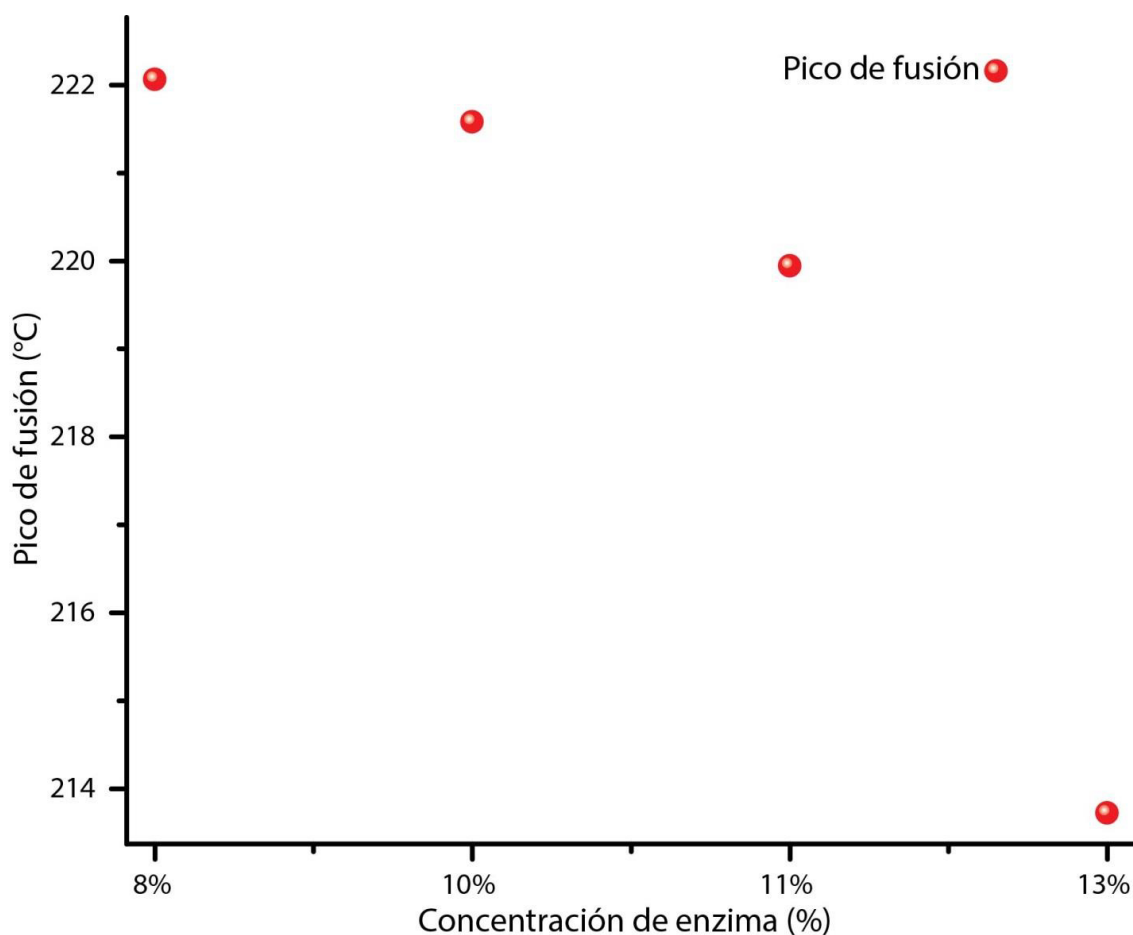


Fig. 20 Comportamiento del pico de fusión con respecto a la concentración enzimática

#### 4.4 Actividad enzimática de la enzima papaína inmovilizada

##### 4.4.1 Sensibilidad de la papaína inmovilizada al cambio en la concentración de los iones metálicos en el medio de reacción

La papaína tiene excelente potencial para ligar iones de metales pesados debido a la presencia del grupo sulfhidrilo (-SH) en su sitio activo [144], por lo cual presenta una sensibilidad a la presencia de distintos tipos de iones metálicos en el medio de reacción. La respuesta de la sensibilidad de la actividad enzimática de la papaína al cambio en la concentración de los distintos iones metálicos en el medio acuoso se puede apreciar en la figura 21, expresada como porcentaje de la actividad enzimática de la papaína libre en solución sin la presencia de iones metálicos en el medio de reacción. Se puede observar que la enzima papaína presenta una afectación de su actividad catalítica proporcional al incremento en la concentración

de los iones metálicos en el medio de reacción; tal y como ha sido reportado en la actividad catalítica de otras proteasas [145][74][76][82][80][81]. Por otra parte, la actividad enzimática de la enzima papaína inmovilizada no siguió el patrón de inhibición esperado ante la presencia del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) por lo que se sugiere la existencia de procesos de inhibición tanto competitivos como acompetitivos en el medio de reacción. La tendencia observada de la actividad catalítica de la enzima inmovilizada exhibe en general una tendencia decreciente conforme aumenta la concentración de los demás tipos de iones metálicos en el medio de reacción. Esta tendencia decreciente en la actividad enzimática tuvo un comportamiento lineal en el caso de los iones mercurio ( $\text{Hg}^{+2}$ ), plata ( $\text{Ag}^{+1}$ ), y cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ). Los factores de correlación ( $R^2$ ) fueron de 0.91 para el ión mercurio ( $\text{Hg}^{+2}$ ) y para el ión plata ( $\text{Ag}^{+1}$ ) y para el ión cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) fue de 0.82. Los demás iones metálicos analizados en este ensayo enzimático no encajaron del todo en el modelo lineal, por lo cual se buscaron otros modelos matemáticos que pudiesen correlacionar el comportamiento de inhibición de la enzima inmovilizada con la presencia de los iones zinc ( $\text{Zn}^{+2}$ ) y cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) en el medio de reacción. Para el ión zinc ( $\text{Zn}^{+2}$ ) el modelo que más se acoplo a su tendencia decreciente en la inhibición enzimática fue el exponencial con un factor de correlación ( $R^2$ ) de 0.94; mientras que para el ion cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) el modelo aplicado con mejor resultado fue el polinomial con un factor de correlación ( $R^2$ ) de 0.82.

En las siguientes secciones se analizará de una manera detallada el comportamiento de cada uno de los iones en el proceso de inhibición enzimática de la papaína inmovilizada, así como su impacto en la salud pública y en el medio ambiente.

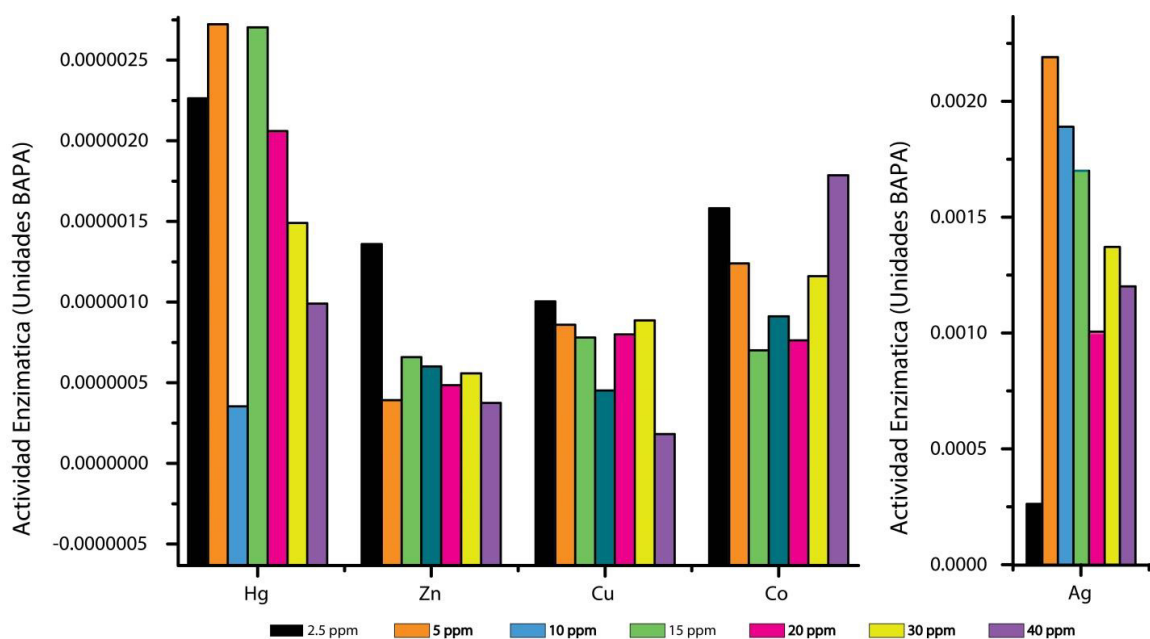


Fig. 21 Sensibilidad de la actividad enzimática de la papaína hacia el cambio de concentración de los diversos metales. Mercurio (Hg), zinc (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co), plata (Ag).

#### 4.4.1.1 Efecto de la presencia del ión mercurio ( $\text{Hg}^{+2}$ ) en el medio de reacción sobre la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.

El mercurio por muchos años fue utilizado para numeros procesos y productos (pinturas, pesticidas, fármacos, tuberías, baterías, piezas dentales, etc), pero debido a que es bioacumulable y un inhibidor de enzimas y proteínas, su uso ha ido disminuyendo paulatinamente, sin embargo hoy en día se sigue utilizando en algunas aplicaciones industriales [146]. La presencia del mercurio en los recursos hídricos ha tenido un gran impacto tanto en la salud pública como en el medio ambiente, ya que se han presentado repercusiones directas en los humanos, plantas, microorganismos. Se ha reportado que el consumo de este metal por medio de la cadena alimenticia es la causa de varias enfermedades neurodegenerativas, tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson[147]. De igual manera se ha reportado que el mercurio elemental e inorgánico pueden dañar el sistema inmunológico y los riñones, mientras que el metil mercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ )<sup>+</sup> supone una amenaza para los sistemas cardiovascular y nervioso[148][149]. La toxicidad del mercurio en plantas afecta el

sistema antioxidante, el sistema de fotosíntesis, inhibe del crecimiento, afecta la absorción de nutrientes y la homeostasis[150][146].

El mercurio puede existir en tres estados de oxidación (+0), (+ 1), (+2), mediante los cuales el ión mercurio forma complejos estables con una variedad de ligandos orgánicos. En la literatura se encuentra reportado que los complejos covalentes más fuertes que forma son con ligandos que contienen grupos sulfhidrilo (-SH) como la cisteína, el siguiente más fuerte es con aminoácidos y ácidos hidroxicarboxílicos[15].

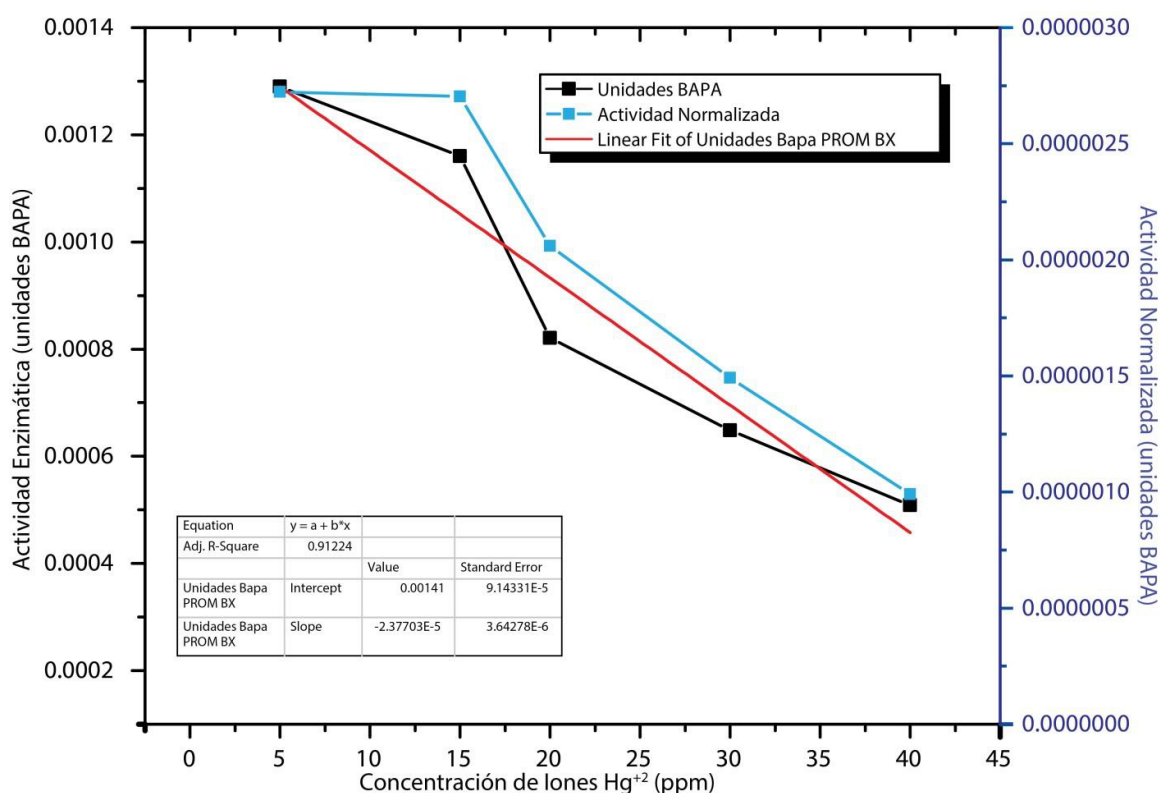


Fig. 22 Tendencia del efecto de la presencia del ión mercurio ( $Hg^{+2}$ ) en la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA.

Pearson y colaboradores, en su trabajo titulado “Hard soft acid-base theory” estableció la teoría en la cual el mercurio es clasificado como un ácido suave, el cual tiende a hacer enlaces fuertes con grupos suaves y básicos como lo son los grupos sulfhidrilo (-SH) [151]. Para correlacionar la concentración de ión mercurio ( $Hg^{+2}$ ) con la actividad de la enzima se utilizó un modelo lineal obteniendo un factor de

correlación ( $R^2$ ) de 0.91 (figura 22), en la cual se puede observar que la actividad enzimática tiene una tendencia a la baja conforme se aumenta la concentración del ión mercurio ( $Hg^{+2}$ ) en el medio de reacción. En este sentido se puede aseverar que la inhibición enzimática de la papaína se debe a que el mercurio se ligó covalentemente con el sitio activo en el cual se encuentra el grupo sulfhidrilo ( $-SH$ ). De igual forma, la tendencia de inhibición de la enzima papaína inmovilizada en la matriz de nanofibras de PVA coincide con el patrón de inhibición que ha sido reportado en anteriores trabajos utilizando la enzima papaína en solución en ensayos enzimáticos. Baskaran et al. utilizaron la proteasa *Coriandrum sativum*, para la detección del mercurio (Hg) y otros metales, los datos de la inhibición de la actividad enzimática que obtuvieron los representan mediante el análisis de regresión no lineal, dicha gráfica presenta un comportamiento similar al que se obtuvo con la enzima papaína inmovilizada en nanofibras poliméricas presentado en este trabajo.[82] . La enzima tripsina, la cual pertenece también a la familia de las proteasas, fue utilizada para la detección del mercurio (Hg) mediante la inhibición enzimática; en este caso el perfil de la inhibición de mercurio (Hg) exhibió una regresión no lineal y se utilizó en su lugar una curva hiperbólica [81], dicha curva concuerda con el perfil de inhibición de la papaína inmovilizada. En todos los experimentos mencionados e incluyendo nuestro trabajo el patrón de inhibición de la enzima tuvo una tendencia decreciente de la actividad enzimática al incrementar la concentración de iones en el medio de reacción.

#### **4.4.1.2 Efecto de la presencia del ión plata ( $Ag^{+1}$ ) en el medio de reacción sobre la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.**

En la figura 23 se puede apreciar el efecto que tuvo la presencia del ión plata ( $Ag^{+1}$ ) en el medio de reacción sobre la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en la matriz de nanofibras poliméricas de PVA. La gráfica muestra una tendencia proporcional a la baja conforme se iba incrementando la concentración de iones plata ( $Ag^{+1}$ ) en el medio de reacción. Esta tendencia de inhibición presenta un factor de correlación ( $R^2$ ) de 0.91 con respecto a un modelo lineal. La presencia de

iones de plata en recursos hídricos se ha incrementado recientemente, debido a su uso extensivo en la industria. Otra explicación a la creciente presencia de este ión en las fuentes de agua se debe al auge de la nanotecnología, en la cual se ha encontrado diversas propiedades para los iones plata, lo anterior debido a su facilidad para la formación de nanoestructuras, concretamente nanopartículas, las cuales destacan por sus propiedades antibacterianas y antiinflamatorias; por lo cual se han utilizado en diversos productos tanto textiles como de uso militar, en el área médica, en óptica, así como en pinturas y cosméticos [152][153]. El ión plata ( $\text{Ag}^{+1}$ ) está catalogado como un ácido suave, por lo que presenta una afinidad natural hacia las bases[154]. De esta manera muestran una tendencia a interactuar con el grupo thiol de la estructura tridimensional de las enzimas, llegando a provocar en algunos casos su desactivación. [155]. Lo anterior puede provocar efectos adversos en la salud, tales como decoloración en la piel (gris azulado) de forma permanente, efectos tóxicos en el hígado y los riñones, así como en los ojos, vías respiratorias y en el tracto intestinal; causando de esta manera irritaciones y cambios adversos en las células sanguíneas [156]. De igual manera, se ha reportado que las nanopartículas de plata pueden llegar a dañar el ADN [153]. Por todo lo anterior cobra especial relevancia la detección temprana del ión plata ( $\text{Ag}^{+1}$ ), estableciendo métodos efectivos y rápidos de control y potencial remoción de este tipo de ión, sobre todo en casos donde una excesiva concentración pueda llevar a daños potenciales por consumo o contacto con ambientes contaminados.



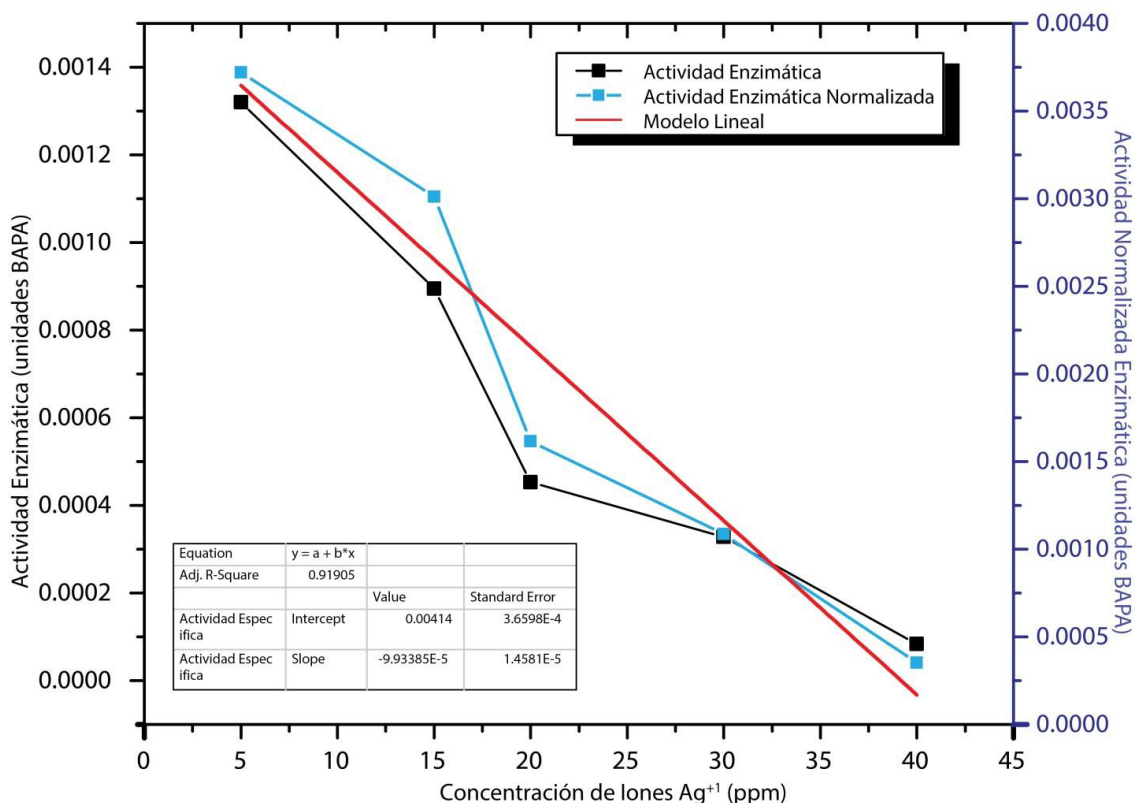


Fig. 23 Tendencia del efecto de la presencia del ión plata ( $\text{Ag}^+$ ) en la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA.

#### 4.4.1.3 Efecto de la presencia del ión cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en el medio de reacción sobre la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.

Para correlacionar la concentración del ión cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en el medio de reacción con la actividad enzimática de la papaína inmovilizada se decidió utilizar un modelo lineal, obteniendo de esta manera un factor de correlación ( $R^2$ ) de 0.82 (figura 24). En dicha gráfica se puede observar el decaimiento de la actividad catalítica enzimática de la enzima inmovilizada conforme se incrementa la concentración del ión  $\text{Cu}^{+2}$  en el medio de reacción. El comportamiento anterior comprueba la afinidad del ión  $\text{Cu}^{+2}$  con la cadena lateral imidazol de la histidina[157].

El cobre se clasifica entre los ácidos duros y blandos. Sus estados de oxidación son (+ 1), (+2) y (+ 3), siendo el estado de oxidación (+2) el más común. El cobre forma complejos con bases duras como el carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), el sulfato

( $\text{SO}_4^{2-}$ ), el cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y el hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) e interactúa fuertemente con el azufre para la formación de sulfuros insolubles relativamente estables [158]. En la literatura se han reportado trabajos con la proteína albúmina de suero bovino (BSA), en los que utilizando un pH de 7.5 el grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) ha formado complejos con el ión  $\text{Cu}^{+2}$  presente en el medio de reacción[159][160]. La inhibición de la enzima papaína, así como de otras enzimas de la familia de las proteasas, debida a la presencia del ión cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en el medio de reacción, ha sido ampliamente reportada en la literatura[76][80][130]. Este comportamiento reportado coincide con el comportamiento de inhibición competitiva reportado en este trabajo de investigación para la enzima papaína inmovilizada en nanofibras poliméricas.

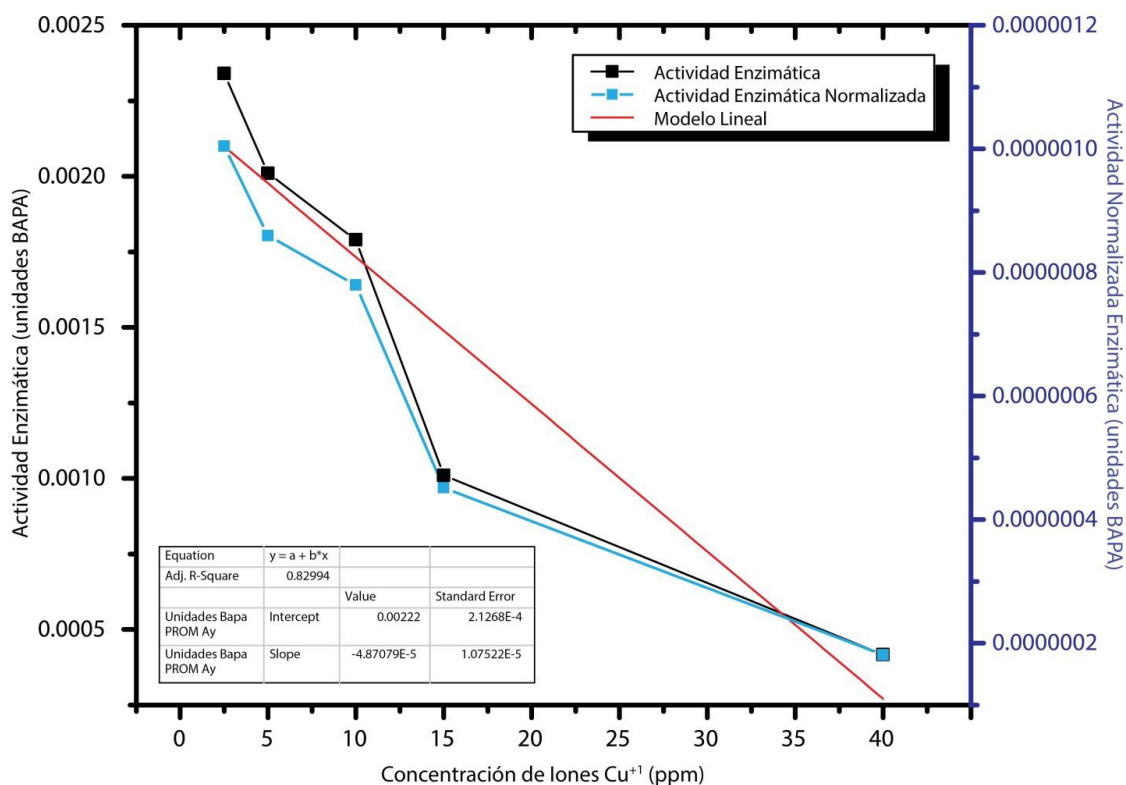


Fig. 24 Tendencia del efecto de la presencia del ión cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en el medio de reacción sobre la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA.

Como se mencionó anteriormente los alimentos contaminados son la fuente más importante en la ingesta de metales pesados. Es en este sentido y siguiendo la cadena trófica, el ión cobre se convierte en el segundo metal más peligroso para las

plantas acuáticas, al aumentar la permeabilidad de la pared celular y desarrollar de esta manera susceptibilidad a la entrada de otros contaminantes. En los peces, por ejemplo, la ingesta de alimentos contaminados por este ión, causa la degeneración en la grasa del hígado y hemorragia cerebral. Sin embargo, por otro lado se ha reportado que los invertebrados en general se han adaptado muy bien a la presencia de altos contenidos de cobre en su medio ambiente natural, aumentando de esta manera la posibilidad de la ingesta de este ión por la población, cobrando especial relevancia su detección en cuerpos de agua y fuentes acuosas contaminadas[15].

#### **4.4.1.4 Efecto de la presencia del ión Zinc en la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.**

El ión zinc ( $Zn^{+2}$ ) es un cofactor esencial en una variedad de procesos celulares, incluyendo la síntesis de ADN, la reproducción, la formación ósea, crecimiento, y la cicatrización de heridas. En la industria es utilizado para galvanizar el hierro y acero, en baterías secas, asimismo es un componente común de los antitranspirantes, astringentes; en el área médica es utilizado como agente de solubilización en muchos medicamentos, incluyendo la insulina, por mencionar algunos usos [161]. La exposición al ión zinc ( $Zn^{+2}$ ) en dosis de consumo consideradas normales no es peligrosa, pero si por alguna razón se consume más de la dosis recomendada (15 mg por día), puede llegar a interferir con la absorción de cobre [162]. El zinc es un agente cáustico que causa la irritación del aparato digestivo después de la ingestión y la irritación de la vía pulmonar después de la inhalación, puede causar diversos problemas de salud que van desde diarreas, vómitos, irritación y corrosión del tracto intestinal hasta la necrosis renal aguda, por lo cual su detección oportuna y precisa se vuelve relevante[163]

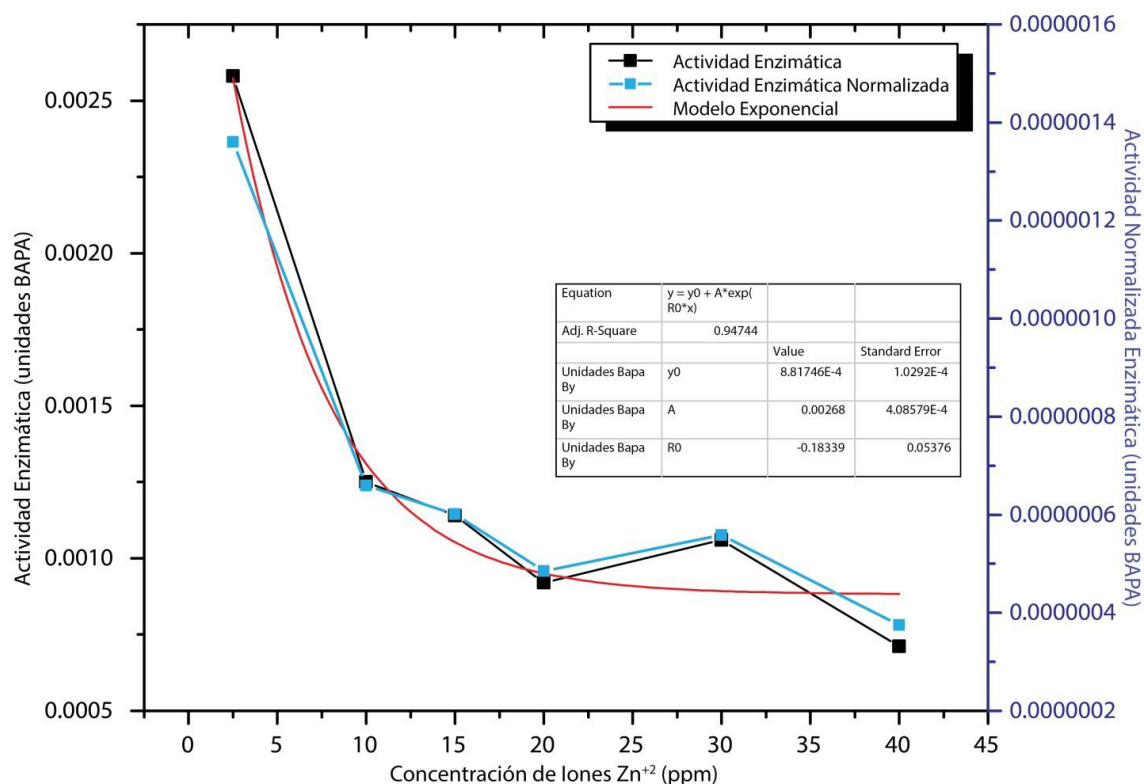


Fig. 25 Tendencia del efecto de la presencia del ión zinc ( $Zn^{+2}$ ) en el medio de reacción sobre la actividad enzimática de la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA.

El modelo matemático exponencial fue el que más se adecuó para describir la inhibición de la actividad enzimática de la enzima papaína inmovilizada debida a la presencia del ión zinc ( $Zn^{+2}$ ) en el medio de reacción, arrojando un factor de correlación ( $R^2$ ) de 0.94 (figura 25). Lo anterior se debe a que el zinc forma complejos tanto con ácidos (donantes de oxígeno) como con ácidos y bases (donantes de azufre). Es importante señalar que el ión  $Zn^{+2}$  en solución acuosa se comporta como un ácido duro, por lo cual tiene la capacidad de formar enlaces con el oxígeno, así como con el nitrógeno y átomos donantes del azufre y también crea puentes de hidrogeno con el anillo de imidazol, aunque rara vez interacciona con los grupos sulfhídricos [15]. Algunos experimentos reportados en la literatura demuestran que el complejo formado entre  $Zn^{+2}$  y la albúmina de suero es reversible a temperatura de  $0^\circ$ , y después se demostró que a temperaturas arriba de  $27^\circ$  se vuelve irreversible provocando la desnaturización de la albúmina de suero en estado libre, también se reportó que el  $Zn^{+2}$  forma complejos con los residuos de histidina[164]. Baskaran y colaboradores utilizaron la proteasa

*Coriandrum sativum*, para la detección del zinc ( $\text{Zn}^{+2}$ ) y mercurio ( $\text{Hg}^{+2}$ ), los datos de la inhibición de la actividad enzimática que obtuvieron los representan mediante el análisis de regresión no lineal, dicha gráfica presenta un comportamiento similar al que se obtuvo con la enzima papaína inmovilizada en este trabajo [82]. Otra proteasa utilizada para la detección de zinc ( $\text{Zn}^{+2}$ ) y mercurio ( $\text{Hg}^{+2}$ ) mediante inhibición enzimática fue la tripsina, la cual mostró un perfil de inhibición no lineal debido a la presencia del ión zinc en el medio de reacción, por lo cual se utilizó una curva de regresión hiperbólica [81], dicha curva concuerda con el perfil de inhibición de la papaína inmovilizada en este trabajo.

#### **4.4.1.5 Efecto de la presencia del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) en el medio de reacción sobre la actividad enzimática de la papaína inmovilizada.**

En la figura 26 podemos observar la sensibilidad de la enzima papaína inmovilizada en nanofibras de PVA a la presencia del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) en el medio de reacción. El modelo matemático que mejor explicó la inhibición enzimática de la papaína inmovilizada en este caso fue el polinomial con un factor de correlación ( $R^2$ ) de 0.82. El comportamiento de inhibición observado en la enzima inmovilizada ante la presencia del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) no siguió un patrón de inhibición enzimático estándar, por lo que basándonos en la literatura sobre el tema, se sugiere que el comportamiento de interacción observado se debió a procesos de inhibición tanto competitivos como acompetitivos[165].

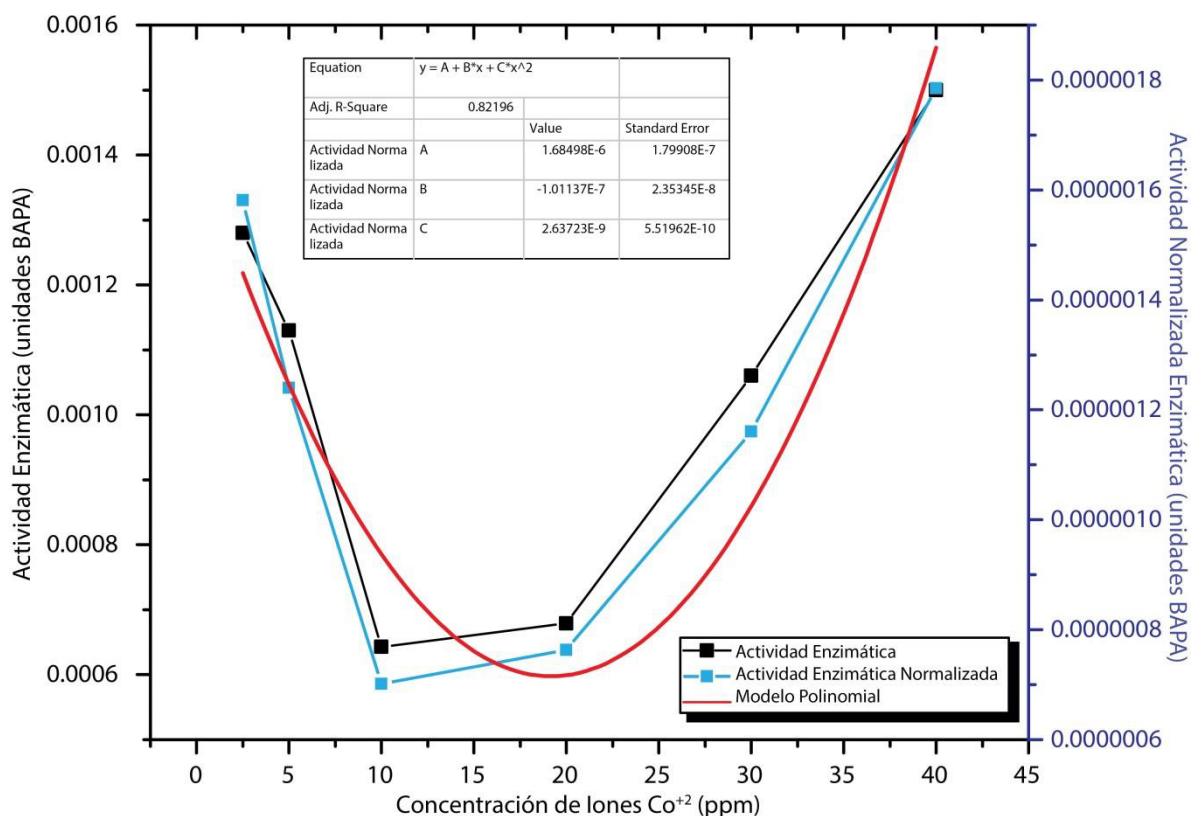


Fig. 26 Tendencia del efecto de inhibición enzimática presentado por la papaína inmovilizada en nanofibras de PVA debido a la presencia del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) en el medio de reacción.

En el mismo sentido se han reportado enzimas que son activadas por la presencia de iones cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) en el medio de reacción a determinadas concentraciones[166][167]. Por lo tanto en este trabajo se propone que la presencia de este ión en el medio de reacción en concentraciones mayores a 20 ppm pudo tener un efecto de activación de la enzima papaína. El cobalto se encuentra en la naturaleza principalmente en la forma de arseniuros, óxidos y sulfuros, y cuenta con una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo (SH)[168]. El elemento cobalto (Co) es un elemento necesario para la formación de la vitamina B12 (hidroxocobalamina). Sin embargo, la administración excesiva de este elemento en el cuerpo produce bocio y reducción de la actividad de la tiroides, mientras que su contacto directo produce asma y dermatitis [168]. En plantas, el exceso de cobalto produce lesiones metabólicas inducidas por un estrés oxidativo[169]. Debido a lo anterior, la detección de la presencia excesiva de este

elemento en su forma de ión es importante para evitar repercusiones en la salud de la población.

#### **4.5 Estudios de interferencia**

Para demostrar la especificidad del ensayo enzimático para la detección de iones metálicos se adicionaron interferentes también llamados xenobióticos, los cuales se definen así por su derivación del griego xeno ('extraño') y bio ('vida'), esta definición se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el ser humano, estos son compuestos que no son esenciales y no funcionales a la vida de los organismos, algunos xenobióticos no son tóxicos; sin embargo, muchos de ellos son potencialmente tóxicos o se vuelve tóxicos después de la conversión de sus compuestos metabólicos intermedios, los cuales no son solubles en agua (compuestos lipófilos), su eliminación de los organismos se lleva a cabo esencialmente mediante las reacciones bioquímicas catalizadas por dos tipos de enzimas: activación y desintoxicación [170]. Los detergentes y disolventes son interferentes comunes en fuentes acuosas, por lo tanto es importante para el desarrollo de cualquier ensayo para detección de metales, que la presencia de estos no ejerza alguna interferencia en la interacción entre los iones metálicos y la enzima inmovilizada.

La enzima papaína presenta características deseables para su utilización en la industria y en la investigación científica tales como una alta estabilidad a variaciones de temperatura, una actividad enzimática dentro de una amplia gama de valores de pH y es tolerante a la presencia de xenobióticos en el medio de reacción [171]. Los resultados que se presentarán en esta sección sustentan la estabilidad del ensayo enzimático propuesto en este trabajo utilizando a la papaína como biocomponente, ya que muestran una estabilidad de la interacción entre la papaína inmovilizada y los iones metálicos ante la presencia de xenobióticos en el medio de reacción. El cálculo del porcentaje de interferencia se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$I = \frac{A_0 - A_i}{A_0}$$

Dónde:  $I$  porcentaje de interferencia de la actividad catalítica,  $A_0$  es la actividad enzimática en ausencia de interferentes (solo la presencia de iones metálicos),  $A_i$  la actividad en presencia de los iones metálicos e interferentes. La actividad catalítica final está correlacionada con la concentración del ion y el interferente elegido en el medio de reacción[172]. La concentración (.25% [v/v]) elegida de los distintos xenobióticos estudiados en este trabajo de investigación fue en general mucho más alta de lo que normalmente se encuentran en fuentes naturales de agua, esto con el fin de aumentar lo más posible la probabilidad de detectar su interferencia en la interacción de la papaína inmovilizada con los iones metálicos en el medio de reacción. Los xenobióticos utilizados en este trabajo son SDS, Nonidet-P40, Tritón-X-100, los cuales han sido reportados en la literatura con una interferencia positiva en la actividad enzimática de la enzima papaína en solución en presencia de iones metálicos en el medio de reacción[76]. Es importante mencionar que la estructura de Tritón-X-100 y Nonidet-P40 son muy parecidas[173].

Se ha reportado que la enzima beta-lactamasa se encuentra entre las moléculas biocatalíticas que en solución forman grandes agregados coloidales, cuando esto sucede existe la disminución de su actividad catalítica a este efecto se le llama efectos inhibitorios (*promiscuous inhibitors*)[174], y encontró que para evitar este efecto se puede añadir el Tritón-X-100 en cantidades pequeñas, el cual suprime la formación de agregados esto mediante la prevención de la adsorción superficial de la enzima, en nuestro caso este comportamiento de formación de grandes agregados se descarta ya que este efecto no es un problema con la enzima inmovilizada[175].

El SDS es un interferente iónico y tiende a desnaturalizar las proteínas, por lo cual causa un efecto de la inhibición catalítica de esta, sin embargo las enzimas inmovilizadas en una matriz polimérica tienden a ser resistentes a cambios conformacionales[83][106][176][92].



#### 4.5.1 Estudio de interferencia de xenobióticos en presencia del ión plata ( $\text{Ag}^{+1}$ )

El perfil del porcentaje de interferencia debido a la presencia de xenobióticos en el medio de reacción cuando se encuentra en contacto la enzima papaína inmovilizada y iones de plata ( $\text{Ag}^{+1}$ ) se puede observar en la figura 27.

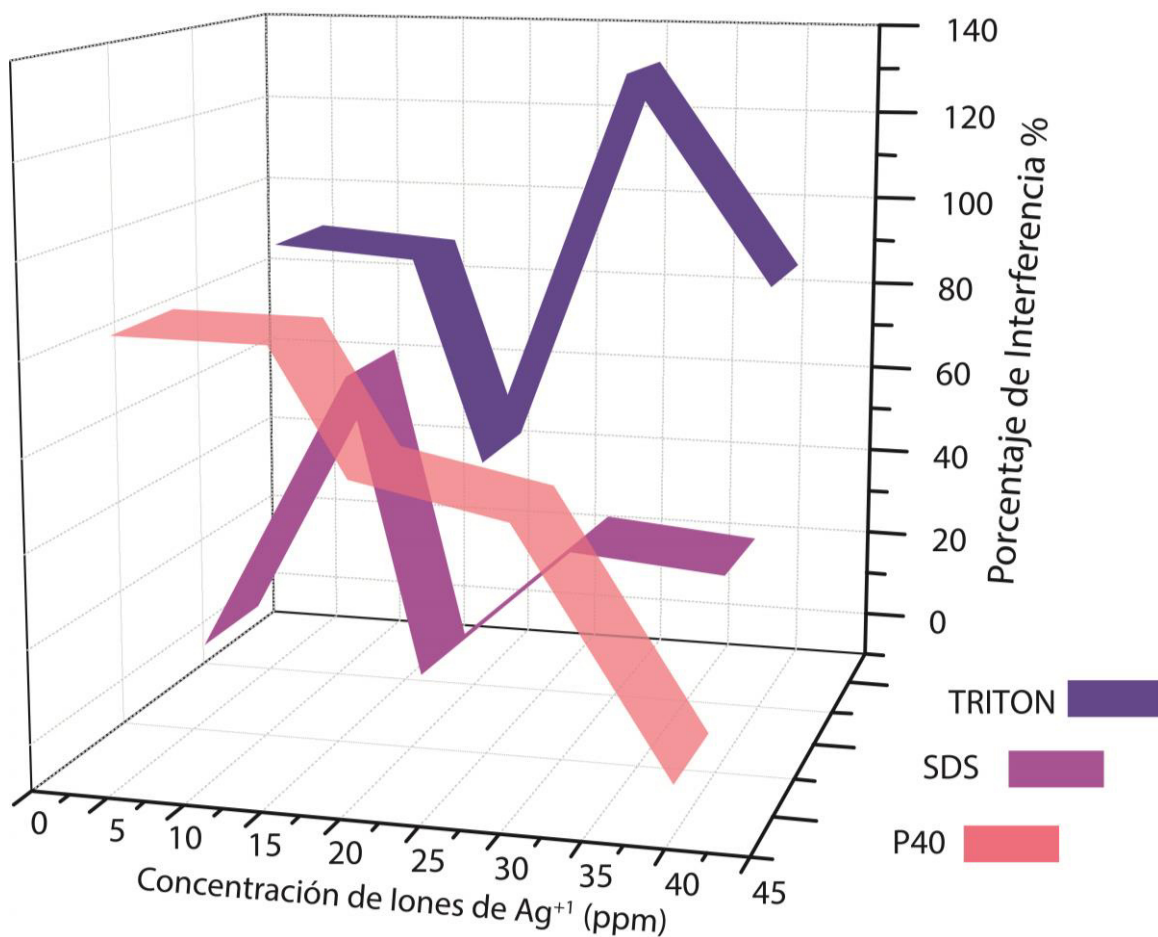


Fig. 27 Porcentaje de interferencia del ión plata ( $\text{Ag}^{+1}$ ) en presencia de xenobióticos en el medio de reacción.

En el experimento se mantuvo constante la cantidad de interferente, solo se incremento la concentración del ión plata ( $\text{Ag}^{+1}$ ). En dicha gráfica puede observar que cuando la concentración ionica en menor el porcentaje de interferencia es alta, pero al ir incrementando la concentración ionica el porcentaje de interferencia

tiende a disminuir, es decir observa un decaimiento en el porcentaje de interferencia.

Para el interferente Tritón-X-100 y SDS no se presentó una tendencia del decaimiento del porcentaje de interferencia, en la gráfica de la figura 28 se puede observar que en la concentración de 30 ppm hubo un aumento del porcentaje de interferencia lo cual se sugiere que en este punto el tipo el interferente impidió la interacción entre el ion y la enzima papaína inmovilizada, sin embargo en las demás concentraciones se observó un perfil de interferencia en decremento conforme al aumento de la concentración de los iones.

#### **4.5.2 Estudio de interferencia en presencia del ion zinc ( $Zn^{+2}$ )**

El perfil del porcentaje de interferencia debido a la presencia de xenobióticos en el medio de reacción cuando se encuentra en contacto la enzima papaína inmovilizada y los iones de zinc ( $Zn^{+2}$ ) se puede observar en la figura 28. En el experimento se mantuvo constante la cantidad de interferente, solo se incrementó la concentración del ión zinc ( $Zn^{+2}$ ).

El porcentaje de interferencia que presenta el ión zinc ( $Zn^{+2}$ ) con respecto a los interferentes P-40, Tritón-X-100 y SDS presenta una tendencia similar para los tres, a una concentración ionica menor el porcentaje de interferencia es mayor, pero conforme se aumenta la concentración ionica este tiende a ir disminuyendo, se observa que en el SDS hay un leve aumento del porcentaje de interferencia en la concentracion de 2.5 ppm. Este patrón de inhibición concuerda con el experimento hecho con solo la presencia de los iones y la enzima inmovilizada y nos da una pauta para poderlo usar como modelo para otro tipo de enzimas.

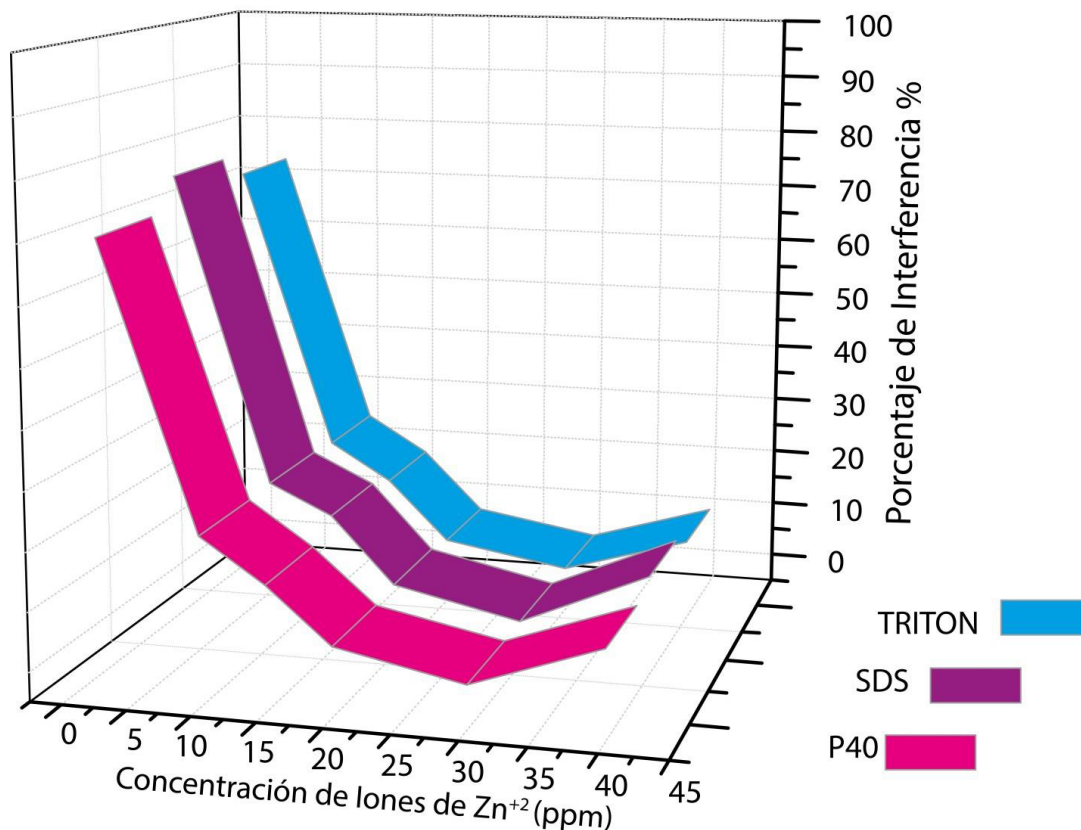


Fig. 28 Porcentaje de interferencia del ión zinc ( $Zn^{+2}$ ) en presencia de xenobióticos en el medio de reacción

#### 4.5.3 Estudio de interferencia en presencia del ión cobre ( $Cu^{+2}$ )

El perfil de interferencia correspondiente a la presencia de los distintos xenobióticos en el medio de reacción de la enzima papaína inmovilizada y en presencia del ión cobre ( $Cu^{+2}$ ) se puede observar en la figura 29. En el experimento se mantuvo constante la cantidad de interferente, solo se incrementó la concentración del ión cobre ( $Cu^{+2}$ ).

La tendencia del porcentaje de interferencia que presenta el ión cobre ( $Cu^{+2}$ ) con respecto al interferente P-40 y Tritón-X-100 son muy similares, presentando un porcentaje de interferencia más alta en la concentración de 5 ppm, pero al aumentar la concentración iónica hubo un decaimiento en la del porcentaje de inhibición, con respecto al SDS el nivel de interferencia fue muy bajo para todas las concentraciones, pero también se puede observar que hay un leve aumento del

porcentaje en la concentración de 5 ppm al igual que los otros dos interferentes probados.

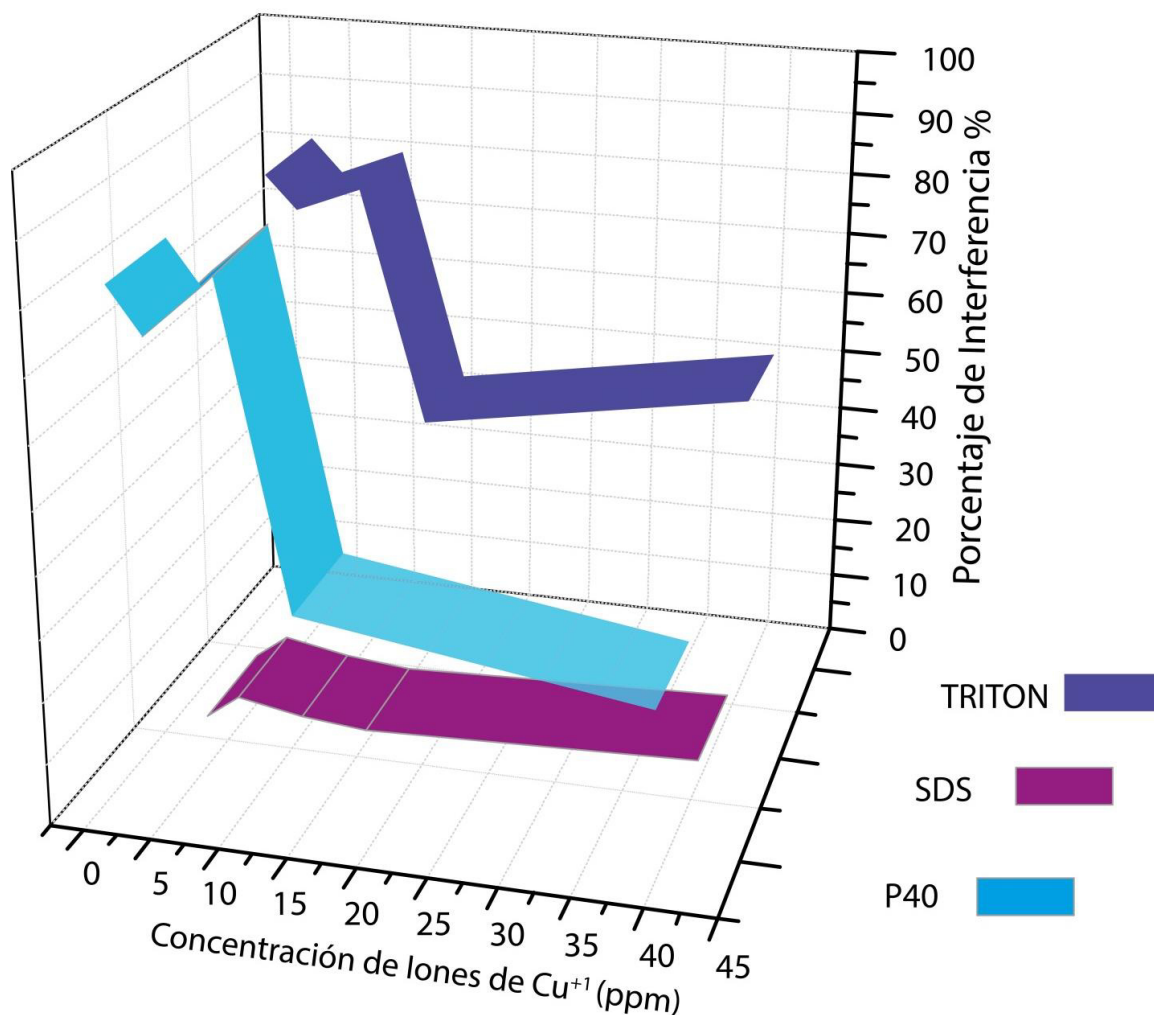


Fig. 29 Porcentaje de interferencia del ión cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en presencia de xenobióticos en el medio de reacción

#### 4.5.4 Estudio de interferencia en presencia del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ )

El perfil del porcentaje de interferencia debido a la presencia de xenobióticos en el medio de reacción cuando se encuentra en contacto la enzima papaína inmovilizada y iones de ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) se puede observar en la figura 30. En el experimento se mantuvo constante la cantidad de interferente, solo se incrementó la concentración del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ).

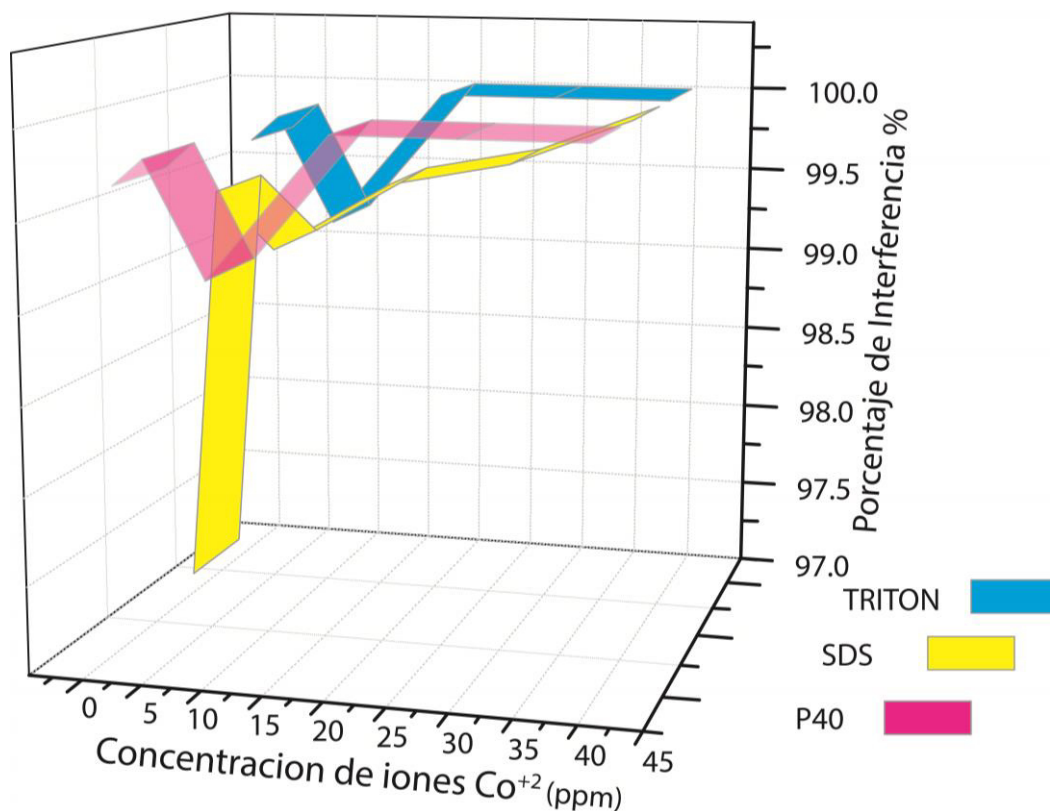


Fig. 30 Porcentaje de interferencia del ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) en presencia de xenobióticos en el medio de reacción

El ión cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) y la enzima papaína Los interferentes P-40 y Tritón-X-100 presentan un perfil de porcentaje de inhibición similar, esto puede ser debido a que su estructura química es muy parecida, ambos en la concentración de 10 ppm tuvieron un leve decremento del porcentaje de inhibición, pero en general en las demás concentraciones el perfil es de inhibición se encuentra es muy alto.

Con respecto al SDS tuvo un aumento abrupto en el porcentaje de inhibición en concentración iónica de de 5 ppm y presentando un decaimiento de esta en la concentración de 10 ppm, sin embargo después de dichas concentraciones siguió una tendencia en la cual fue aumentando el porcentaje de inhibición conforme aumento la concentración ionica del cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ).

En general los interferentes utilizados para las pruebas no afectaron la actividad catalítica de la papaína en relación con la enzima inmovilizada en presencia de iones metálicos.

Con estos resultados se puede observar como la enzima papaína inmovilizada en nanofibras poliméricas fue utilizada como biocomponente para el desarrollo de un ensayo enzimático para la detección de la presencia de iones metálicos en el medio de reacción. Como precedente, se puede encontrar en la literatura que en presencia de xenobióticos las proteasas mantienen su actividad catalítica en concentraciones de 1% (w/w)[177]. En este sentido, en las gráficas mostradas en esta sección se puede observar que la interacción entre la papaína inmovilizada y los iones metálicos presentes en el medio de reacción es tolerante a la presencia de este tipo de contaminantes, dicha tolerancia es debido en gran parte a su naturaleza y al proceso de inmovilización. Dicho ensayo se puede usar como base para el desarrollo de un dispositivo tecnológico altamente específico para la detección de iones metálicos sin perder efectividad por la presencia por xenobióticos en el medio de reacción.

## Referencias

- [1] A. Br.,utigam, "The freshwater crisis: Basic elements," in *World Conservation*, vol. 30, no. 2, 1999, pp. 45–113.
- [2] *World Health Statistics 2015*. 2015.
- [3] CONAGUA, "Estadísticas del Agua en México," *Uso Del Agua*, vol. Capitulo 3, p. 14, 2011.
- [4] M. D. DeLong, *Rivers of North America*. 2005.
- [5] I. S. Cohen, Ú. O. Spring, and G. D. Padilla, "Water Resources in Mexico," *Water Resour. Mex. Scarcity, Degrad. Stress. Conflicts, Manag. Policy*, vol. 7, pp. 39–49, 2011.
- [6] C. M. Lewandowski, N. Co-investigator, and C. M. Lewandowski, *Water Resources in Mexico*, vol. 7. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [7] W. Schwartz, "G. EVELYN HUTCHINSON, A Treatise on Limnology, Vol. I, Part: 1 Geography and Physics of Lakes. XIV, 540 S., 154 Abb., 63 Tab., 11 Tafeln. Vol. I, Part 2: Chemistry of

Lakes. XIV, 474 S., 74 Abb., 69 Tab. (Verbesserter Neudruck der Ausgabe von 1957). New Y," *Z. Allg. Mikrobiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 256–257, 1977.

- [8] R. Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., & Gupta, "Heavy metals and living systems: An overview," *Indian J. Pharmacol.*, vol. 43(3), p. 246–253., 2011.
- [9] S. S. Ahmad, M. R. Azim, M. Bilal, Q. Mahmood, and A. Rashid, "Current Status of Toxic Metals Addition to Environment and Its Consequences," in *The Plant Family Brassicaceae*, vol. 21, 2012, pp. 35–69.
- [10] H. Ali, E. Khan, and M. A. Sajad, "Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications," *Chemosphere*, vol. 91, no. 7, pp. 869–881, 2013.
- [11] J. O. Nriagu, "The rise and fall of leaded gasoline," *Sci. Total Environ.*, vol. 92, pp. 13–28, 1990.
- [12] R. a. Wuana and F. E. Okieimen, "Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation," *ISRN Ecol.*, vol. 2011, pp. 1–20, 2011.
- [13] N. C. Brady and R. R. Weil, *The nature and properties of soils*, vol. 13, no. Ed. 11. 2002.
- [14] G. Bánfalvi, *Heavy metals, trace elements and their cellular effects*. 2011.
- [15] J. W. More and R. S., *Heavy Metal in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment*. 1984.
- [16] Ministerio de Medio Ambiente de Japón, "Enseñanzas de la Enfermedad de Minamata y el Manejo del Mercurio en Japón," *Div. la Salud y Segur. Medioambient. Dep. Salud Ambient. Minist. del Medio Ambient. Japón*, 2012.
- [17] P. L. Smedley, "Chapter 7 Arsenic in groundwater – south and east Asia," pp. 180–209, 2003.
- [18] U. K. Chowdhury, B. K. Biswas, T. R. Chowdhury, G. Samanta, B. K. Mandal, G. C. Basu, C. R. Chanda, D. Lodh, K. C. Saha, S. K. Mukherjee, S. Roy, S. Kabir, Q. Quamruzzaman, and D. Chakraborti, "Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India," *Environ. Health Perspect.*, vol. 108, no. 5, pp. 393–397, 2000.
- [19] S. S. Afzal Hossain, M. Fazle Rabbi, Abdur Rahman Abid, "Arsenic Problem in Groundwater, a Growing Threat to Public Health in Bangladesh: An Overall Perspective and Management Modelling Approach," in *Groundwater Updates*, 2000, pp. 473–474.
- [20] L. Rodríguez-Lado, G. Sun, M. Berg, Q. Zhang, H. Xue, Q. Zheng, and C. A. Johnson,

"Groundwater Arsenic Contamination Throughout China," *Science (80-. )*, vol. 341, no. 6148, pp. 866–868, 2013.

- [21] † Michael Berg \*, ‡ Hong Con Tran, ‡ Thi Chuyen Nguyen, ‡ Hung Viet Pham, † Roland Schertenleib, and and Walter Giger†, "Arsenic Contamination of Groundwater and Drinking Water in Vietnam: A Human Health Threat," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, no. 13, pp. 2621–2626, 2001.
- [22] C.-H. Tseng, "An overview on peripheral vascular disease in blackfoot disease-hyperendemic villages in Taiwan.," *Angiology*, vol. 53, no. 5, pp. 529–537, 2002.
- [23] W. P. Tseng, "Effects and dose--response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic," *Env. Heal. Perspect.*, vol. 19, pp. 109–119, 1977.
- [24] C. J. Chen, Y. C. Chuang, T. M. Lin, and H. Y. Wu, "Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: High-arsenic artesian well water and cancers," *Cancer Res.*, vol. 45, no. 11 II, pp. 5895–5899, 1985.
- [25] C. Puthiyasekar, M. a Neelakantan, and S. Poongothai, "Heavy metal contamination in bore water due to industrial pollution and polluted and non polluted sea water intrusion in Thoothukudi and Tirunelveli of South Tamil Nadu, India.," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 85, no. 6, pp. 598–601, 2010.
- [26] A. Waseem, J. Arshad, F. Iqbal, A. Sajjad, Z. Mehmood, and G. Murtaza, "Pollution Status of Pakistan: A Retrospective Review on Heavy Metal Contamination of Water, Soil, and Vegetables," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–29, 2014.
- [27] J. E. Bunnell, R. B. Finkelman, J. A. Centeno, and O. Selinus, "Medical Geology: A globally emerging discipline," *Geologica Acta*, vol. 5, no. 3. pp. 273–281, 2007.
- [28] J. Bundschuh, A. P. Carrera, and M. Litter, "Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana," ... *Iberoam. Cienc. y ...*, 2008.
- [29] D. L. López, J. Bundschuh, P. Birkle, M. A. Armienta, L. Cumbal, O. Sracek, L. Cornejo, and M. Ormachea, "Volcanic arsenic and boron pollution of Ilopango lake," in *Geogenic Arsenic in Groundwater of Latin America*, 2008, pp. 129–143.
- [30] D. L. López, J. Bundschuh, P. Birkle, M. A. Armienta, L. Cumbal, O. Sracek, L. Cornejo, and M. Ormachea, "Arsenic in volcanic geothermal fluids of Latin America.," *Sci. Total Environ.*, vol. 429, pp. 57–75, 2012.
- [31] B. R. Figueiredo, M. I. Litter, C. R. Silva, N. Mañay, S. C. Londono, A. M. Rojas, C. Garzón, T.



- Tosiani, G. M. Di Giulio, E. M. De Capitani, Â. J. Dos Anjos, R. S. Angélica, M. C. Morita, M. M. B. Paoliello, F. G. Cunha, A. M. Sakuma, and O. A. Licht, "Medical Geology Studies in South America," in *Medical Geology*, 2010.
- [32] M. C. Silva-Forsberg, B. R. Forsberg, and V. K. Zeidemann, "Mercury Contamination in Humans Linked to River Chemistry in the Amazon Basin," *Ambio*, vol. 28, pp. 519–521, 1999.
- [33] O. Malm, "Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon," *Environ. Res.*, vol. 77, no. 2, pp. 73–8, 1998.
- [34] A. C. Barbosa, S. R. L. Silva, and J. G. Dórea, "Concentration of mercury in hair of indigenous mothers and infants from the Amazon basin," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 34, no. 1, pp. 100–105, 1998.
- [35] A. C. Barbosa, A. M. Garcia, and J. R. De Souza, "Mercury contamination in hair of riverine populations of Apiacas reserve in the Brazilian Amazon," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 97, no. 1–2, pp. 1–8, 1997.
- [36] J. E. M. Beurskens, G. A. J. Mol, H. L. Barreveld, B. van Munster, and H. J. Winkels, "Geochronology of priority pollutants in a sedimentation area of the rhine river," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 12, no. 9, pp. 1549–1566, 1993.
- [37] H. J. Winkels, J. P. M. Vink, J. E. M. Beurskens, and S. B. Kroonenberg, "Distribution and geochronology of priority pollutants in a large sedimentation area, River Rhine, The Netherlands," *Appl. Geochemistry*, vol. 8, no. 2, pp. 95–101, 1993.
- [38] T. Hamers, J. H. Kamstra, J. van Gils, M. C. Kotte, and A. G. van Hattum, "The influence of extreme river discharge conditions on the quality of suspended particulate matter in Rivers Meuse and Rhine (The Netherlands)," *Environ. Res.*, vol. 143, pp. 241–255, 2015.
- [39] F. Paez-Osuna, H. Bojorquez-Leyva, M. Berges-Tiznado, O. A. Rubio-Hernandez, J. F. Fierro-Sanudo, J. Ramirez-Rochin, and J. A. Leon-Canedo, "Heavy metals in waters and suspended sediments affected by a mine tailing spill in the upper San Lorenzo River, Northwestern Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 94, no. 5, pp. 583–588, 2015.
- [40] E. D. González-González, L. M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, P. Vieyra-Reyes, H. Islas-Flores, S. García-Medina, J. M. Jiménez-Vargas, C. Razo-Estrada, and R. Pérez-Pastén, "Metals and Nonsteroidal Anti-inflammatory Pharmaceuticals Drugs Present in Water from Madín Reservoir (Mexico) Induce Oxidative Stress in Gill, Blood, and Muscle of Common Carp (*Cyprinus carpio*)," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 67, no. 2, pp. 281–295, 2014.

- [41] Ó. Raúl, M. -Villa, M. Ortega-Escobar, C. Ramírez-Ayala, E. Uscanga-Mortera, R. Ramos-Bello, Y. Amada, and L. Reyes-Ortigoza, "METALES PESADOS TOTALES Y ARSÉNICO EN EL AGUA PARA RIEGO DE PUEBLA Y VERACRUZ, MÉXICO," *Rev. Int. Contam. Ambie*, vol. 28, no. 1, pp. 39–48, 2012.
- [42] I. Rubio-Franchini, M. López-Hernández, M. G. Ramos-Espinosa, and R. Rico-Martínez, "Bioaccumulation of Metals Arsenic, Cadmium, and Lead in Zooplankton and Fishes from the Tula River Watershed, Mexico," *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 227, no. 1, p. 5, 2016.
- [43] A. G. Romero-Calderón, B. Morales-Vela, R. Rosfles-Martínez, L. D. Olivera-Gómez, and A. Delgado-Estrella, "Metals in Bone Tissue of Antillean Manatees from the Gulf of Mexico and Chetumal Bay, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, pp. 9–14, 2015.
- [44] C. Jane Wyatt, "Incidence of Heavy Metal Contamination in Water Supplies in Northern Mexico," *Environ. Res.*, vol. 76, no. 2, pp. 114–119, 1998.
- [45] L. Rosales-Hoz and a. Carranza-Edwards, "Heavy metals in sediments from Coatzacoalcos River, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 60, pp. 553–561, 1998.
- [46] S. F. Villanueva and A. V Botello, "Metal pollution in coastal areas of Mexico,," *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 157, pp. 53–94, 1998.
- [47] R. Iturbe, R. M. Flores, and L. G. Torres, "Soil and water contamination levels in an out-of-service oil distribution and storage station in Michoacan, Mexico," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 146, pp. 261–281, 2003.
- [48] I. Razo, L. Carrizales, J. Castro, F. Díaz-Barriga, and M. Monroy, "Arsenic and Heavy Metal Pollution of Soil, Water and Sediments in a Semi-Arid Climate Mining Area in Mexico," *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 152, no. 1–4, pp. 129–152, 2003.
- [49] J. R. Parga, D. L. Cocke, J. L. Valenzuela, J. a. Gomes, M. Kesmez, G. Irwin, H. Moreno, and M. Weir, "Arsenic removal via electrocoagulation from heavy metal contaminated groundwater in la Comarca Lagunera Mexico," *J. Hazard. Mater.*, vol. 124, no. 1–3, pp. 247–254, 2005.
- [50] J. García-Hernández, L. García-Rico, M. E. Jara-Marini, R. Barraza-Guardado, and A. Hudson Weaver, "Concentrations of heavy metals in sediment and organisms during a harmful algal bloom (HAB) at Kun Kaak Bay, Sonora, Mexico,," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 50, no. 7, pp. 733–9, 2005.
- [51] S. C. Gardner, S. L. Fitzgerald, B. A. Vargas, and L. M. Rodriguez, "Heavy metal accumulation in four species of sea turtles from the Baja California Peninsula, Mexico," *Biometals*, vol. 19, no.

1, pp. 91–99, 2006.

- [52] C. González-Macías, I. Schifter, D. B. Lluch-Cota, L. Méndez-Rodríguez, and S. Hernández-Vázquez, "Distribution, enrichment and accumulation of heavy metals in coastal sediments of Salina Cruz Bay, México," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 118, pp. 211–230, 2006.
- [53] N. Cantú-Medellín, N. O. Olguín-Monroy, L. C. Méndez-Rodríguez, and T. Zenteno-Savín, "Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahía de La Paz, Mexico.," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 56, no. 1, pp. 60–6, 2009.
- [54] L. Cadena-Cárdenas, L. Méndez-Rodríguez, T. Zenteno-Savín, J. García-Hernández, and B. Acosta-Vargas, "Heavy metal levels in Marine Mollusks from areas with, or without, mining activities along the Gulf of California, Mexico," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 57, no. 1, pp. 96–102, 2009.
- [55] A. Gómez-Alvarez, D. Meza-Figueroa, A. I. Villalba-Atondo, J. L. Valenzuela-García, J. Ramírez-Hernández, and J. Almendariz-Tapia, "Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005), Mexico-US border," *Environ. Geol.*, vol. 57, pp. 1469–1479, 2009.
- [56] M. De La Luz Vázquez-Sauceda, G. Aguirre-Guzmán, J. G. Sánchez-Martínez, and R. Pérez-Castañeda, "Cadmium, lead and zinc concentrations in water, sediment and oyster (*Crassostrea virginica*) of San Andres Lagoon, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 86, no. 4, pp. 410–414, 2011.
- [57] M. R. Mayorquín, "Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de una hidroeléctrica (P.H. Las Cruces) en Nayarit, México," p. 168, 2011.
- [58] M. De La Luz Vázquez-Sauceda, R. Pérez-Castañeda, J. G. Sánchez-Martínez, and G. Aguirre-Guzmán, "Cadmium and lead levels along the estuarine ecosystem of Tigre River-San Andres Lagoon, Tamaulipas, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 89, no. 4, pp. 782–785, 2012.
- [59] C. P. Ley-Quinónez, A. A. Zavala-Norzagaray, J. G. Réndon-Maldonado, T. L. Espinosa-Carreón, A. Canizales-Román, D. C. Escobedo-Urías, M. L. Leal-Acosta, C. E. Hart, and A. A. Aguirre, "Selected Heavy Metals and Selenium in the Blood of Black Sea Turtle (*Chelonia mydas agasiizzi*) from Sonora, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 91, no. 6, pp. 645–651, 2013.

- [60] P. Spanopoulos-Zarco, J. Ruelas-Inzunza, M. Meza-Montenegro, K. Osuna-Sánchez, and F. Amezcua-Martínez, "Health risk assessment from mercury levels in bycatch fish species from the coasts of Guerrero, Mexico (Eastern Pacific)," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 93, no. 3, pp. 334–8, 2014.
- [61] A. A. Zavala-Norzagaray, C. P. Ley-Quinónez, T. L. Espinosa-Carreón, A. Canizalez-Román, C. E. Hart, and A. A. Aguirre, "Trace Elements in Blood of Sea Turtles *Lepidochelys olivacea* in the Gulf of California, Mexico," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 93, no. 5, pp. 536–541, 2014.
- [62] S. Guédron, C. Duwig, B. L. Prado, D. Point, M. G. Flores, and C. Siebe, "(Methyl)Mercury, Arsenic, and Lead Contamination of the World's Largest Wastewater Irrigation System: the Mezquital Valley (Hidalgo State—Mexico)," *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 225, no. 8, p. 2045, 2014.
- [63] F. Arduini and G. Palleschi, *4 - Screening and confirmatory methods for the detection of heavy metals in foods*. Woodhead Publishing Limited, 2013.
- [64] NMX-AA-051-SCFI-2001, "Análisis De Agua - Determinación De Metales Por Absorción Atómica En Aguas Naturales , Potables , Residuales Y Residuales Tratadas - Método De Prueba ( Cancela a La Nmx-Aa-051-1981 ) Water Analysis - Determination of Metals By Atomic Absorption in Natural," pp. 1–47, 2001.
- [65] G. Plascencia, "Espectrometría de masas," pp. 1–40, 2003.
- [66] D. Martínez B., a. J. Barón González, and O. D. Gil Novoa, "Espectrometría de fluorescencia de rayos X," *Rev. la Soc. Colomb. Física*, vol. 38, no. 2, pp. 790–793, 2006.
- [67] G. Aragay and A. Merkoc, "Recent Trends in Macro- , Micro- , and Nanomaterial-Based Tools and Strategies for Heavy-Metal Detection," pp. 3433–3458, 2011.
- [68] A. Mimendia, A. Legin, A. Merko??i, and M. del Valle, "Use of Sequential Injection Analysis to construct a potentiometric electronic tongue: Application to the multidetermination of heavy metals," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 146, no. 2, pp. 420–426, 2010.
- [69] N. Verma and M. Singh, "Biosensors for heavy metals," *BioMetals*, vol. 18, no. 2, pp. 121–129, 2005.
- [70] Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, and T. Machinami, "Mercury II -Mediated Formation of Thymine - Hg II - Thymine Base Pairs in DNA Duplexes," pp. 2172–2173, 2006.

- [71] E. Diesel, M. Schreiber, and J. R. Van Der Meer, "Development of bacteria-based bioassays for arsenic detection in natural waters," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, no. 3, pp. 687–693, 2009.
- [72] I. Bontidean, C. Berggren, G. Johansson, E. Csöregi, B. Mattiasson, J. R. Lloyd, K. J. Jakeman, and N. L. Brown, "Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors," *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 19, pp. 4162–4169, 1998.
- [73] P. Chen, B. Greenberg, S. Taghavi, C. Romano, D. Van Der Lelie, and C. He, "An exceptionally selective lead(II)-regulatory protein from *Ralstonia metallidurans*: Development of a fluorescent lead(II) probe," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 44, no. 18, pp. 2715–2719, 2005.
- [74] M. Y. Shukor, N. A. Bakar, A. R. Othman, I. Yunus, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "Development of an inhibitive enzyme assay for copper," *J. Environ. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 39–44, 2009.
- [75] X. Zhu, L. Xu, Y. Lou, H. Yu, X. Li, D. A. Blake, and F. Liu, "Preparation of specific monoclonal antibodies (MAbs) against heavy metals: MAbs that recognize chelated cadmium ions," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 19, pp. 7648–7653, 2007.
- [76] Y. Shukor, N. A. Baharom, F. A. Rahman, M. P. Abdullah, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "Development of a heavy metals enzymatic-based assay using papain," *Anal. Chim. Acta*, vol. 566, no. 2, pp. 283–289, 2006.
- [77] M. Lorenzo, D. Moldes, S. Rodríguez Couto, and M. A. Sanromán, "Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds," *Chemosphere*, vol. 60, no. 8, pp. 1124–1128, 2005.
- [78] O. Prakash, M. Talat, S. H. Hasan, and R. K. Pandey, "Enzymatic detection of heavy metal ions in aqueous solution from vegetable wastes by immobilizing pumpkin (*Cucumis melo*) urease in calcium alginate beads," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 13, no. 2, pp. 210–216, 2008.
- [79] N. Wahab, SMA and Gunasekaran, B and Shaharuddin, NA and Johari, WLW and Halmi, MIE and Said, NAM and Shukor, MY Abd and Masdor, "A novel method for the determination of mercury in herbal preparation using an inhibitive assay based on the protease papain," *J. Env. Microbiol Toxicol*, vol. 1(1), pp. 1–4, 2013.
- [80] M. Y. Shukor, N. Masdor, N. A. Baharom, J. A. Jamal, M. P. A. Abdullah, N. A. Shamaan, and M. A. Syed, "An inhibitive determination method for heavy metals using bromelain, a cysteine protease," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 144, no. 3, pp. 283–291, 2008.
- [81] M. Y. Shukor, N. A. Baharom, N. A. Masdor, M. P. A. Abdullah, N. A. Shamaan, J. A. Jamal, and M.

- A. Syed, "The development of an inhibitive determination method for zinc using a serine protease," *J. Environ. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 17–22, 2009.
- [82] G. Baskaran, N. A. Masdor, M. A. Syed, and M. Y. Shukor, "An inhibitive enzyme assay to detect mercury and zinc using protease from coriandrum sativum," *Sci. World J.*, vol. 2013, 2013.
- [83] I. E. Moreno-Cortez, J. Romero-García, V. González-González, D. I. García-Gutierrez, M. A. Garza-Navarro, and R. Cruz-Silva, "Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of {PVA} cross-linked with glutaraldehyde vapor," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 52, pp. 306–314, 2015.
- [84] B. Brena, P. Gonzalez-Pombo, and F. Batista-Viera, "Immobilization of enzymes: A literature survey," *Immobil. Enzym. Cells Third Ed.*, vol. 1051, pp. 15–31, 2013.
- [85] M. V. Vol'kenshtein, *Enzyme Physics*, vol. 1. Boston, MA: Springer US, 1969.
- [86] E. Fischer, "Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme," *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 27, pp. 2985–2993, 1894.
- [87] D. E. Koshland, "The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 33, no. 2324, pp. 2375–2378, 1995.
- [88] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, and G. Bohlmann, "Industrial use of immobilized enzymes," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 15, pp. 6437–6474, 2013.
- [89] I. Benucci, M. Esti, and K. Liburdi, "Effect of free and immobilised stem bromelain on protein haze in white wine," *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 20, no. 3, pp. 347–352, 2014.
- [90] A. Kaur and J. N. Chakraborty, "Controlled eco-friendly shrink-resist finishing of wool using bromelain," *J. Clean. Prod.*, Aug. 2015.
- [91] H. R. Maurer, "Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 58, no. 9, pp. 1234–1245, 2001.
- [92] S. Datta, L. R. Christena, and Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials," *3 Biotech*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2013.
- [93] R. Sharma, *Enzyme Inhibition and Bioapplications*. InTech, 2012.
- [94] A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, and G. Palleschi, "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 8, pp. 1405–1423, 2006.

- [95] C. Spahn and S. D. Minter, "Enzyme Immobilization in Biotechnology," *Recent Patents Eng.*, vol. 2, no. 3, pp. 195–200, 2008.
- [96] J. Kim, J. W. Grate, and P. Wang, "Nanostructures for enzyme stabilization," *Chemical Engineering Science*, vol. 61, no. 3, pp. 1017–1026, 2006.
- [97] I. Chibata, T. Tosa, T. Mori, T. Watanabe, and N. Sakata, "Immobilized tannin - a novel adsorbent for protein and metal ion," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 8, no. 3, pp. 130–136, 1986.
- [98] T. Xie, A. Wang, L. Huang, H. Li, Z. Chen, Q. Wang, and X. Yin, "Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization," *African J. Biotechnol.*, vol. 8, no. 19, pp. 4724–4733, 2009.
- [99] I. Kim, S. Choi, S. Kim, and J. Jang, *Smart Sensors for Health and Environment Monitoring*. 2015.
- [100] E. L. Rexeisen, W. Fan, T. O. Pangburn, R. R. Taribagil, F. S. Bates, T. P. Lodge, M. Tsapatsis, and E. Kokkoli, "Self-Assembly of Fibronectin Mimetic Peptide-Amphiphile Nanofibers," *Langmuir*, vol. 26, no. 3, pp. 1953–1959, 2010.
- [101] † Guicun Li\* and Zhikun Zhang, "Synthesis of Dendritic Polyaniline Nanofibers in a Surfactant Gel," *Macromolecules*, vol. 37, no. 8, pp. 2683–2685, 2004.
- [102] X. Liu and P. X. Ma, "Gelatin Scaffolds," *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4094–4103, 2010.
- [103] X. B. Xing, Y. Q. Wang, and B. J. Li, "Nanofiber drawing and nanodevice assembly in poly(trimethylene terephthalate)," *Opt. Express*, vol. 16, no. 14, pp. 10815–10822, 2008.
- [104] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, and S. S. Ramkumar, "Electrospinning of nanofibers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 557–569, 2005.
- [105] D. H. Reneker and I. Chun, "Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning," *Nanotechnology*, vol. 7, no. 3, pp. 216–223, 1999.
- [106] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [107] S. Saallah, M. N. Naim, I. W. Lenggoro, M. N. Mokhtar, N. F. A. Bakar, and M. Gen, "Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning," *Biotechnol. Reports*, vol. 10, pp. 44–48, 2016.

- [108] M. Maryšková, I. Ardao, C. A. García-González, L. Martinová, J. Rotková, and A. Ševců, "Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 89, pp. 31–38, 2016.
- [109] T. R. Silva, D. P. Rodrigues, J. M. S. Rocha, M. H. Gil, S. C. S. Pinto, J. A. Lopes-da-Silva, and A. J. Guiomar, "Immobilization of trypsin onto poly(ethylene terephthalate)/poly(lactic acid) nonwoven nanofiber mats," *Biochem. Eng. J.*, vol. 104, pp. 48–56, 2015.
- [110] J. Li, Z. Zhao, T. Mo, L. Wang, and P. Li, "Immobilization of aminoacylase on electrospun nanofibrous membrane for the resolution of dl-theanine," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 116, pp. 24–28, 2015.
- [111] S. Ghosh, S. R. Chaganti, and R. S. Prakasham, "Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme l-asparaginase," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 74, no. 1–2, pp. 132–137, 2012.
- [112] P. Sathishkumar, J. C. Chae, A. R. Unnithan, T. Palvannan, H. Y. Kim, K. J. Lee, M. Cho, S. Kamala-Kannan, and B. T. Oh, "Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 51, no. 2, pp. 113–118, 2012.
- [113] P. C. Chen, X. J. Huang, F. Huang, Y. Ou, M. R. Chen, and Z. K. Xu, "Immobilization of lipase onto cellulose ultrafine fiber membrane for oil hydrolysis in high performance bioreactor," *Cellulose*, vol. 18, pp. 1563–1571, 2011.
- [114] Y. Dai, L. Yin, and J. Niu, "Laccase-Carrying Electrospun Fibrous Membranes for Adsorption and Degradation of PAHs in Shoal Soils," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 24, pp. 10611–10618, 2011.
- [115] D. N. Tran, D.-J. Yang, and K. J. B. Jr., "Fabrication of cellulase protein fibers through concentric electrospinning," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 1–5, 2011.
- [116] S. M. Lee, L. H. Jin, J. H. Kim, S. O. Han, H. Bin Na, T. Hyeon, Y. M. Koo, J. Kim, and J. H. Lee, "β-Glucosidase coating on polymer nanofibers for improved cellulosic ethanol production," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 33, no. 1, pp. 141–147, 2010.
- [117] A. Moradzadegan, S.-O. Ranaei-Siadat, A. Ebrahim-Habibi, M. Barshan-Tashnizi, R. Jalili, S.-F. Torabi, and K. Khajeh, "Immobilization of acetylcholinesterase in nanofibrous PVA/BSA membranes by electrospinning," *Eng. Life Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 57–64, 2010.



- [118] P. Chen, Y.-J. Sun, Z.-C. Zhu, R.-X. Wang, X.-D. Shi, C. Lin, and Y.-T. Ye, "A controlled release system of superoxide dismutase by electrospun fiber and its antioxidant activity in vitro," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 609–14, 2010.
- [119] P. Kocbek, J. A. N. Pelipenko, J. Kristl, R. Rošic, P. Kocbek, J. A. N. Pelipenko, J. Kristl, and S. Baumgartner, "Nanofibers and their biomedical use," *Acta Pharm.*, vol. 63, no. 3, pp. 295–304, 2013.
- [120] T. J. Sill and H. A. von Recum, "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008.
- [121] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. 2007.
- [122] O. P. Ward, "3.49 - Proteases," in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Second Edi., M. Moo-Young, Ed. Burlington: Academic Press, 2011, pp. 571–582.
- [123] I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M. B. A. Swarte, and J. Drenth, "Structure of papain refined at 1.65 ?? resolution," *J. Mol. Biol.*, vol. 179, no. 2, pp. 233–256, 1984.
- [124] M. Novinec and B. Lenarcic, "Papain-like peptidases: Structure, function, and evolution," *Biomol. Concepts*, vol. 4, no. 3, pp. 287–308, 2013.
- [125] I. B. Klein and J. F. Kirsch, "The activation of papain and the inhibition of the active enzyme by carbonyl reagents," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 21, pp. 5928–5935, 1969.
- [126] A. K. Patel, R. R. Singhanian, and A. Pandey, "Novel enzymatic processes applied to the food industry," *Current Opinion in Food Science*, vol. 7, pp. 64–72, 2016.
- [127] D. L. Purich, "Chapter 1 - An Introduction to Enzyme Science," *Enzym. Kinet. Catal. & Control*, pp. 1–51, 2010.
- [128] S. Solís, J. Paniagua, J. C. Martínez, and M. Asomoza, "Immobilization of papain on mesoporous silica: pH effect," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 37, no. 2, pp. 125–127, 2006.
- [129] A. Homaei, H. Barkheh, R. Sariri, and R. Stevanato, "Immobilized papain on gold nanorods as heterogeneous biocatalysts," *Amino Acids*, vol. 46, no. 7, pp. 1649–1657, 2014.
- [130] X. Y. Liu, H. Y. Zeng, M. C. Liao, B. Feng, and B. F. C. A. Gohi, "Interaction of mercury and copper on papain and their combined inhibitive determination," *Biochem. Eng. J.*, vol. 97, pp. 125–131, 2015.
- [131] R. Ahmad and M. Sardar, "Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as

- Immobilization Matrix," *Biochem. Anal. Biochem.*, vol. 4, no. 2, 2015.
- [132] F. López-Gallego, J. M. Guisan, and L. Betancor, *Immobilization of Enzymes and Cells*, vol. 1051. Totowa, NJ: Humana Press, 2013.
- [133] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. C. Rodrigues, and R. Fernandez-Lafuente, "Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 207890, p. 1583, 2014.
- [134] Y. Wang and Y. L. Hsieh, "Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes," *J. Memb. Sci.*, vol. 309, no. 1–2, pp. 73–81, 2008.
- [135] L. Wu, X. Yuan, and J. Sheng, "Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning," *J. Memb. Sci.*, vol. 250, no. 1–2, pp. 167–173, 2005.
- [136] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [137] L. Wollweber, "S. P. Colowick and N. O. Kaplan (Editors-In-Chief), *Methods in Enzymology* Volume 121: Immunochemical Techniques, Part I, Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies (Editors: J. J. LANGONE, H. VAN VUNAKIS). XIX + 947 S., 131 Tab., 215 Abb. Orlando-San ," *J. Basic Microbiol.*, vol. 27, no. 7, p. 368, 1987.
- [138] L. Wu, X. Yuan, and J. Sheng, "Immobilization of cellulase in nanofibrous {PVA} membranes by electrospinning," *J. Memb. Sci.*, vol. 250, no. 1–2, pp. 167–173, 2005.
- [139] M. G. Sankalia, R. C. Mashru, J. M. Sankalia, and V. B. Sutariya, "Physicochemical characterization of papain entrapped in ionotropically cross-linked kappa-carrageenan gel beads for stability improvement using Doehlert shell design," *J. Pharm. Sci.*, vol. 95, no. 9, pp. 1994–2013, 2006.
- [140] G. Vedantham, H. G. Sparks, S. U. Sane, S. Tzannis, and T. M. Przybycien, "A holistic approach for protein secondary structure estimation from infrared spectra in H<sub>2</sub>O solutions," *Anal. Biochem.*, vol. 285, pp. 33–49, 2000.
- [141] a. h. Kuptsov and g. n. Zhizhin, *Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers*. 1998.
- [142] K. C. S. Figueiredo, T. L. M. Alves, and C. P. Borges, "Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 111, no. 6, pp. 3074–3080, 2009.

- [143] V. M. Gun'ko, P. Pissis, A. Spanoudaki, V. I. Zarko, Y. M. Nychiporuk, L. S. Andriyko, E. V. Goncharuk, R. Leboda, J. Skubiszewska-Zieba, V. D. Osovskii, and Y. G. Ptushinskii, "Relaxation phenomena in poly(vinyl alcohol)/fumed silica affected by interfacial water," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 312, no. 2, pp. 201–213, 2007.
- [144] A. Ü. Metin and E. Alver, "Fibrous polymer-grafted chitosan/clay composite beads as a carrier for immobilization of papain and its usability for mercury elimination," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 39, no. 7, pp. 1137–1149, 2016.
- [145] S. M. A. Wahab, B. Gunasekaran, N. A. Shaharuddin, W. L. W. Johari, M. I. E. Halmi, N. A. M. Said, M. Y. Shukor, and N. A. Masdor, "A novel method for the determination of mercury in herbal preparation using an inhibitive assay based on the protease papain," *J. Environmental Microbiol. Toxicol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–4, 2013.
- [146] J. Wang, X. Feng, C. W. N. Anderson, Y. Xing, and L. Shang, "Remediation of mercury contaminated sites - A review," *J. Hazard. Mater.*, vol. 221–222, pp. 1–18, 2012.
- [147] J. Mutter, J. Naumann, C. Sadaghiani, H. Walach, and G. Drasch, "Amalgam studies: disregarding basic principles of mercury toxicity," *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 207, no. 4, pp. 391–397, 2004.
- [148] A. H. Stern, "A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment," *Environmental Research*, vol. 98, no. 1, pp. 133–142, 2005.
- [149] H. T. Hogberg, A. Kinsner-Ovaskainen, S. Coecke, T. Hartung, and A. K. Bal-Price, "mRNA expression is a relevant tool to identify developmental neurotoxicants using an in vitro approach," *Toxicol. Sci.*, vol. 113, no. 1, pp. 95–115, 2009.
- [150] M. Israr and S. V. Sahi, "Antioxidative responses to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 44, no. 10, pp. 590–595, 2006.
- [151] G. Pearson, "Hard and Soft Acids and Bases," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 85, no. 22, pp. 3533–3539, 1963.
- [152] M. Rai, A. Yadav, and A. Gade, "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials," *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 1, pp. 76–83, 2009.
- [153] D. McShan, P. C. Ray, and H. Yu, "Molecular toxicity mechanism of nanosilver," *J. Food Drug Anal.*, vol. 22, no. 1, pp. 116–127, 2014.
- [154] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramírez, and M. J.

- Yacaman, "The bactericidal effect of silver nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, 2005.
- [155] Y. Matsumura, K. Yoshikata, S. Kunisaki, and T. Tsuchido, "Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, no. 7, pp. 4278–4281, 2003.
- [156] S. Prabhu and E. K. Poulouse, "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects," *Int. Nano Lett.*, vol. 2, no. 1, p. 32, 2012.
- [157] R. Say, B. Garipcan, and S. Emir, "Preparation of poly ( hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylamidohistidine ) beads and its design as a affinity adsorbent for Cu ( II ) removal from aqueous solutions," *Adsorpt. J. Int. Adsorpt. Soc.*, vol. 196, pp. 199–207, 2002.
- [158] F. R. N. Gurd and P. E. Wilcox, "Complex Formation between Metallic Cations and Proteins, Peptides, and Amino Acids," *Adv. Protein Chem.*, vol. 11, no. C, pp. 311–427, 1956.
- [159] J. Q. Lu, F. Jin, T. Q. Sun, and X. W. Zhou, "Multi-spectroscopic study on interaction of bovine serum albumin with lomefloxacin-copper(II) complex," *Int J Biol Macromol*, vol. 40, no. 4, pp. 299–304, 2007.
- [160] Y. Zhang and D. E. Wilcox, "Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 7, no. 3, pp. 327–337, 2002.
- [161] a B. Abdel-Mageed and F. W. Oehme, "A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron: I. Zinc.," *Vet. Hum. Toxicol.*, vol. 32, no. 1, pp. 34–39, 1990.
- [162] L. M. Klevay, S. J. Reck, and D. F. Barcome, "Evidence of dietary copper and zinc deficiencies.," *Jama J. Am. Med. Assoc.*, vol. 241, no. 18, pp. 1916–1918, 1979.
- [163] G. J. Fosmire, "Zinc toxicity," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 51, no. 2, pp. 225–227, 1990.
- [164] H. Waldmann-Meyer, "Thermodynamic Proton-, Cadmium-, and Zinc-Binding Constants of Serum Albumin Determined by Zone Electrophoresis," *J. Biol. Chem.*, vol. 235, pp. 3337--3345, 1960.
- [165] R. Sharma, "Enzyme Inhibition : Mechanisms and Scope," *Enzym. Inhib. Bioapplications*, pp. 3–36, 2012.
- [166] M. Kobayashi and S. Shimizu, "Cobalt proteins," *Eur. J. Biochem.*, vol. 261, no. 1, pp. 1–9, 1999.

- [167] R. A. Martinelli, G. R. Hanson, J. S. Thompson, B. Holmquist, J. R. Pilbrow, D. S. Auld, and B. L. Vallee, "Characterization of the Inhibitor Complexes of Cobalt Carboxypeptidase A by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy," *Biochemistry*, vol. 28, no. 1987, pp. 2251–2258, 1989.
- [168] D. G. Barceloux, "Cobalt," *Clin. Toxicol.*, vol. 37, no. 2, pp. 201–216, 1999.
- [169] R. K. Tewari, P. Kumar, P. N. Sharma, and S. S. Bisht, "Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt," *Plant Sci.*, vol. 162, no. 3, pp. 381–388, 2002.
- [170] S. Thakur and S. N. Rao, *Activation and Detoxification Enzymes*, no. 1. 2014.
- [171] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. 2007.
- [172] S. Sanllorente-Méndez, O. Domínguez-Renedo, and M. Julia Arcos-Martínez, "Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. Application to the determination of arsenic(III)," *Sensors*, vol. 10, no. 3, pp. 2119–2128, 2010.
- [173] M. WINDHOLZ, "The Merck Index Online," *Science (80-. )*, vol. 226, no. 4680, pp. 1250–1250, Dec. 1984.
- [174] Brian Y Feng, Anang Shelat, Thompson N Dorman, R Kip Guy, and Brian K Shoichet, "High-throughput assays for promiscuous inhibitors," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 1, no. 3, pp. 146–148, 2005.
- [175] S. L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, and B. K. Shoichet, "Article A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and," pp. 1712–1722, 2002.
- [176] B. Bolto, T. Tran, M. Hoang, and Z. Xie, "Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes," *Progress in Polymer Science (Oxford)*, vol. 34, no. 9. pp. 969–981, 2009.
- [177] M. M. Burrell, *Enzymes of Molecular Biology*, vol. 16. New Jersey: Humana Press, 1993.

## 5. Conclusiones

La encapsulación y posterior inmovilización de la enzima papaína en nanofibras de PVA fue replicada con éxito de acuerdo al procedimiento previamente reportado por nuestro grupo de investigación. La morfología fibrosa de las muestras se mantuvo incluso después del procedimiento de entrecruzamiento con glutaraldehído y a la inmersión en buffer para la medición de la actividad enzimática. El valor central de la distribución de diámetros se mantuvo dentro del rango nanométrico en todas las muestras. La presencia de la papaína en las nanofibras electrohiladas de PVA se confirmó a través de la técnica de espectroscopia de infrarrojo (FTIR), donde se pudieron observar las bandas de absorción características de las proteínas enzimáticas. En las muestras con la papaína inmovilizada se observaron bandas de absorción características de las moléculas de glutaraldehído, corroborando de esta manera el proceso de entrecruzamiento de las nanofibras de PVA.

Por medio del análisis térmico mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) se pudo conocer la interacción entre las cadenas poliméricas y las moléculas de enzima. Se pudo constatar que al aumentar la concentración enzimática en las nanofibras electrohiladas de PVA se presentó un decaimiento en la temperatura de transición vítrea de la matriz polimérica ( $T_g$ ). Este aumento en la movilidad en las cadenas poliméricas se relacionó con un impedimento estérico provocado por la presencia en aumento de las moléculas enzimáticas en la matriz polimérica. De igual manera el análisis de la entalpía de fusión y del pico de fusión confirmó una disminución de la cristalinidad y del tamaño de cristalito respectivamente en la matriz polimérica conforme iba en aumento la concentración polimérica en las nanofibras electrohiladas.

Se realizó el análisis de forma cualitativa de la inhibición de la actividad catalítica de la enzima papaína en presencia de iones metálicos y xenobióticos en solución. Lo anterior establece las bases para la fabricación de un bioensayo enzimático especializado para la efectiva detección de iones de metales pesados en solución. Dicho bioensayo tendrá potencial aplicación en la detección de la presencia de iones metálicos en fuentes de agua contaminadas por residuos industriales o naturales.

La aplicación de los modelos matemáticos para la interpretación de la disminución de la actividad enzimática en presencia de iones metálicos puede ser utilizada como base para el desarrollo y explicación del comportamiento de otras enzimas en presencia de iones metálicos y xenobióticos.

### **5.1 Trabajo a futuro**

El desarrollo de este ensayo establece las bases para trabajar con otras enzimas cuya actividad catalítica es sensible a la presencia de iones metálicos en el medio de reacción. Como trabajo futuro, nuestro equipo de investigación buscará trabajar con estas enzimas tanto en solución como inmovilizadas en nanofibras poliméricas para analizar el comportamiento de su actividad catalítica en la presencia de iones metálicos en el medio de reacción. De la misma forma, se proyecta como trabajo futuro el diseño y fabricación de un dispositivo –de preferencia portátil– que utilice la enzima inmovilizada papaína como base en la detección *in situ* de iones metálicos en fuentes de aguas contaminadas.